

Université de Montréal

Effets de la purification d'alginate et de la co-encapsulation avec des cellules canaliculaires sur la survie et fonction d'îlots de Langerhans microencapsulés

Par

Geneviève Langlois

Département de Médecine, Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de M.Sc.

en Sciences Biomédicales

option générale

Janvier, 2010

© Geneviève Langlois, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire s'intitule :

Effets de la purification d'alginate et de la co-encapsulation avec des
cellules canaliculaires sur la survie et fonction d'îlots de Langerhans
microencapsulés

Présenté par :

Geneviève Langlois

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Ashok K. Srivastava

président-rapporteur

Jean-Pierre Hallé

directeur de recherche

Louise Larose

membre du jury

Résumé

La transplantation d'îlots chez des sujets diabétiques permet la normalisation de leur glycémie mais nécessite l'utilisation d'immunosuppresseurs. Afin d'éliminer l'utilisation de ceux-ci, une capsule d'alginate capable d'immunoprotéger l'îlot a été proposée. Cependant, un problème persiste : la survie de l'implant est limitée. Deux moyens afin d'améliorer ce facteur seront présentés dans ce mémoire: l'utilisation d'alginate purifié et la co-encapsulation des îlots avec des cellules canaliculaires pancréatiques.

La première étude rapporte un aspect nouveau : les effets directs de l'alginate non-purifié, versus purifié, sur la survie d'îlots encapsulés. Ceci est démontré *in vitro* sur la viabilité à long terme des îlots, leur fonction et l'incidence de leur mort cellulaire par apoptose et nécrose. Ces investigations ont permis de conclure que l'alginate purifié permet de maintenir à long terme une meilleure survie et fonction des îlots. De plus, cette étude ajoute un autre rôle aux contaminants de l'alginate en plus de celui d'initier la réaction immunitaire de l'hôte; celle-ci étant indirectement reliée à la mort des îlots encapsulés.

La deuxième étude consiste à déterminer les impacts possibles d'une co-encapsulation d'îlots de Langerhans avec des cellules canaliculaires pancréatiques. Les résultats obtenus démontrent que cette co-encapsulation n'améliore pas la survie des îlots microencapsulés, par des tests de viabilité et de morts cellulaires, ni leur fonction *in vivo* testée par des implantations chez un modèle murin immunodéficient.

Pour conclure, la survie des îlots encapsulés peut être améliorée par la purification de l'alginate mais reste inchangée lors d'une co-encapsulation avec des cellules canaliculaires pancréatiques.

Mots clés : Diabète de type 1, encapsulation d'îlots, survie, biocompatibilité, fonction

Abstract

Islets transplantation can normalize glycaemia in diabetic patients but only with the use of immunosuppressive drugs. The elaboration of an alginate microcapsule to immunoprotect the islets has been developed to overcome the use of those harmful drugs. However, one problem still subsists: the limited survival of the transplant. Two different aspects to overcome this problem will be discussed in this thesis: the use of purified alginate and the co-encapsulation of islets with pancreatic duct cells.

The first study investigated a new proposition: the direct effects of non-purified alginate, compared to the purified one, on the survival of encapsulated islets. This was demonstrated by *in vitro* studies on the islets long-term viability, function and the incidence of their death by apoptosis and necrosis. These investigations helped us to conclude that purified alginate can maintain a better long-term survival and function of encapsulated islets. This investigation also demonstrated that alginate contaminants have a direct influence on encapsulated cells besides their role in immune cell activation; which have an indirect implication in the encapsulated islets death.

The second study investigated the possible effects of pancreatic duct cells when co-encapsulated with islets of Langerhans. The results showed no significant effects on the viability of co-encapsulated islets, by viability and cellular death assays, and neither on their function *in vivo* tested with implantations in a mouse immunodeficient model.

To conclude, alginate purification appeared to improve the survival of encapsulated islets while pancreatic duct cells failed to do the same.

Keywords : Type 1 diabetes, islets encapsulation, survival, biocompatibility, function

D.1.1 Résultats complémentaires	62
D.2 Effects of the co-encapsulation of duct cells with islets on the viability and function of islets.....	64
D.2.1 Résultats complémentaires	94
E. Discussion	101
E.1 Biocompatibilité	101
E.2 Co-encapsulation des îlots et cellules canaliculaires	107
F. Conclusion et perspectives	116
G. Sources bibliographiques	119

Liste des tableaux

Tableau I : *Incidence annuelle du diabète de type 1 dans certains pays industrialisés en 2006*.....**3**

Tableau II : *Différents groupes d'insuline vendus au Canada ainsi que leur délai d'action, action maximale et temps d'action respectifs.***9**

Liste des figures

Figure 1 : <i>Localisation des cellules β pancréatiques.</i>	2
Figure 2 : <i>Structure de la proinsuline et de l'insuline.</i>	4
Figure 3 : <i>Concept d'immunoisolement d'un îlot de Langerhans encapsulé.</i>	13
Figure 4 : <i>Trois types d'encapsulation différents. A. Macrocapsules intravasculaires, B. Macrocapsules extravasculaires, C. Microcapsules.</i>	15
Figure 5 : <i>Structure des acides mannuroniques (M) et guluroniques (G).</i>	17
Figure 6 : <i>Formation d'une microcapsule d'alginate-PLL-alginate (APA) à l'aide d'une différence de voltage et représentation des différentes couches.</i>	18
Figure 7 : <i>Structure chimique principale des endotoxines.</i>	21
Figure 8 : <i>A. Îlots de Langerhans co-encapsulés avec des cellules canaliculaires pancréatiques. B. Cellules canaliculaires en culture</i>	31

Liste des sigles et abréviations

α	alpha
β	beta
δ	delta
ε	epsilon
κ	kappa
μ	micro
μm	micromètre
γ	gamma
$^{\circ}\text{C}$	degré Celsius
μm	micromètre
AO	acridine orange
ADN	acide désoxyribonucléique
APA	alginate-poly-L-lysine-alginate
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BM	'basement membrane'
CTLA-4	'cytotoxic T lymphocyte antigen-4'
Cellules NK	cellules 'natural killer'
Cellules T _C	cellules T cytotoxiques
Cellules T _H	cellules T 'helper'
CK	cytokératine
cm	centimètre
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
Da	dalton
DCM	'duct conditioned medium'

ECM	'extracellular membrane'
EGF	'endothelial growth factor'
FFE	'free flow electrophoresis'
g	gramme
HBSS	'Hank's balanced salt solution'
HLA	'human leukocyte antigen'
IBMIR	'instant blood-mediated inflammatory reaction'
Idd	'insulin-dependent diabetes'
IDDM	'insulin-dependent diabetes mellitus'
IEs	îlot-équivalents
IFN	interféron
IGF-II	'insulin-like growth factor-II'
IL	interleukine
IMEMZO	'improved MEM zinc option'
iNOS	'inducible nitric oxide synthase'
kDa	kilodalton
LPS	lipopolysaccharide
mL	millilitre
mM	millimole
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
M _w	'molecular weight'
MWCO	'molecular weight cut-off'
ng	nanogramme
nm	nanometre(s)
NO	oxide nitrique
NOS	'nitric oxide synthase'

O/N	'over-night'
PBS	'phosphate-buffered solution'
PFC	perfluorocarbone
pH	potentiel hydrogène
SCID	'severe combined immunodeficiency'
SEM	'standard error of the mean'
SNPs	'single nucleotide polymorphism'
PI	iodure de propidium
PLL	poly-L-lysine
RE	réticulum endoplasmique
SBTI	'soy bean trypsin inhibitor'
SEM	'standard error of the mean'
TLR	'toll-like receptor'
TNF	'tumor necrosis factor'
TUNEL	'tdt-mediated dUTP nick end labelling' technique
U	unité(s)
UW	solution de l'Université du Wisconsin
VEGF	'vascular endothelial growth factor'
v/v	'volume per volume'
w/v	'weight per volume'
XPS	'X-ray photoelectron spectroscopy'

À Gilberte, une grand-mère qui est partie en laissant un grand vide mais qui a su insuffler à sa petite-fille sa grande détermination, merci.

À Anne et Pierre, des parents dévoués et débordants de générosité.

Remerciements

Un grand merci à Dr Hallé de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir épaulé tout au long de mon stage de BAC et de ma maîtrise.

Un merci *tout spécial* à Mme Julie Dusseault de m'avoir prise sous son aile et de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche sous un angle aussi stimulant.

Un **GROS** merci à toute l'équipe du laboratoire, Mme Susan K. Tam et Mme Stéphanie Bilodeau, de m'avoir encouragée et poussée à me dépasser par l'entremise de leurs précieux conseils.

Merci à mes parents d'être ce qu'ils sont, d'avoir toujours cru en moi et de m'aider avec autant de dévotion.

Merci à ma famille de m'avoir encouragée avec autant de chaleur et d'amour.

À tous ceux qui m'entourent, vous êtes la source de ma réussite.

A.Introduction

A.1 Le diabète

Il existe trois différents types de diabète. Le premier, celui de type 1, sera discuté dans la section **A.2**. Le second, le diabète de type 2, est causé par une résistance de l'organisme à l'insuline et est associé à une baisse relative et progressive de fonction des cellules β pancréatiques [1]. Ainsi, le corps utilise d'une façon non-adéquate l'insuline. Ce type de diabète résulte principalement d'un embonpoint important et d'un manque d'exercice physique. Cependant, la prédisposition génétique est également impliquée [2]. Il a également été évalué qu'une activité physique d'une durée de 30 minutes quotidiennement peut diminuer de 40% le risque de développer ce type de diabète [3]. Finalement, le diabète gestationnel touche environ 2 à 4% des grossesses [3] et est caractérisé par une intolérance aux carbohydrates débutant vers la fin du 2^e et au 3^e trimestre de la grossesse [3, 4].

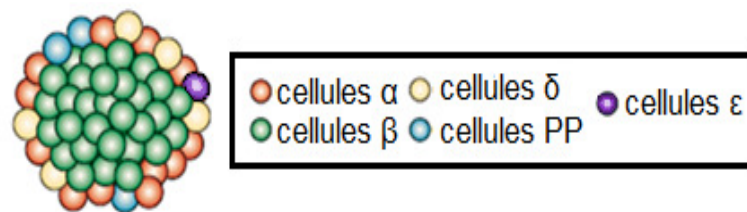
Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre total actuel de diabétiques dans le monde serait autour des 180 millions d'individus et pourrait possiblement doubler d'ici 2030 [2]. Au Canada, l'agence de la santé publique a évalué qu'en 2005-2006, un Canadien sur 17 avait obtenu un diagnostic de diabète; représentant 5,5% de toutes les femmes et 6,2% chez les hommes [5].

Le diabète a également des effets importants sur la situation économique de certains pays. En fait, il a été estimé qu'en Chine, le diabète et certains de ses effets secondaires seront la cause d'une perte d'environ 550 millions de dollars au cours des dix prochaines années avec un accroissement de 3 000 nouveaux cas par jour [2, 6]. Aux États-Unis, par an, le diabète sera la cause d'une perte de 105 milliards de dollars et causera la mort de 200 000 personnes [7]; tandis qu'au Canada, les pertes annuelles atteindront possiblement 8 milliards de dollars canadiens en 2016 [8].

A.2 Diabète de type 1

Cette maladie est causée par une destruction progressive des cellules β pancréatiques localisées dans le centre des îlots de Langerhans (voir **Figure 1**). Ces cellules représentent environ 60 à 80% de l'îlot et ont pour fonction la sécrétion de l'insuline, une hormone qui permet l'absorption, le métabolisme et l'entreposage du glucose dans les tissus périphériques. Ainsi, cette diminution de cellules s'accompagnera d'une baisse importante de production d'insuline qui occasionnera une augmentation graduelle du glucose sanguin.

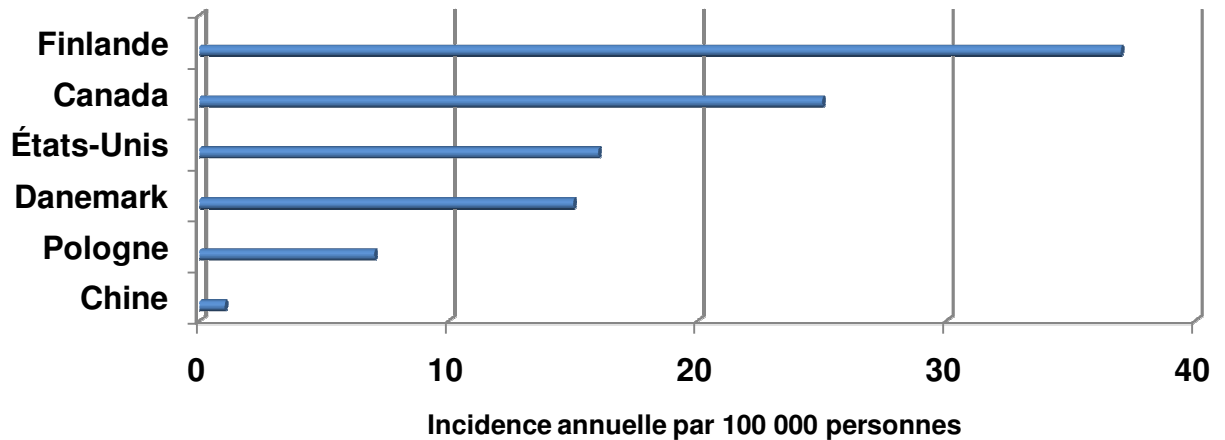
Figure 1 : *Localisation des cellules β pancréatiques*



Plusieurs conséquences majeures à long-terme peuvent être causées par un mauvais contrôle de cette maladie : les principales sont la rétinopathie, pouvant mener à la cécité, les neuropathies, lésions occasionnées au niveau des nerfs, l'amputation, résultant d'une mauvaise circulation sanguine et les incidents cardiovasculaires [2].

De plus, la prévalence semble être dépendante du pays d'origine quant au diabète de type 1. Ainsi, un enfant finlandais a environ 40 fois plus de chance de développer la maladie qu'un enfant originaire de Chine (voir **Tableau I**).

Tableau I : *Incidence annuelle du diabète de type 1 dans certains pays industrialisés en 2006*



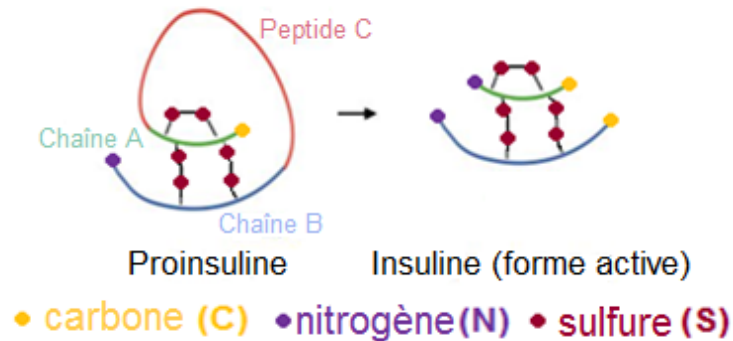
adapté de [9]

A.2.1 Pathogénèse

Cette maladie chronique est dite auto-immune en raison du rôle important du système immunitaire dans son déclenchement. Cependant, les premiers symptômes ne surviennent qu'au moment où 70-80% des cellules β sont détruites; ce qui implique une progression lente mais constante de la maladie [9].

Il existe deux mécanismes principaux responsables de la maladie, les voies directe et indirecte, qui sont tous deux activés par la reconnaissance d'auto-antigènes des cellules β . Ceux-ci sont entre-autres la proinsuline, l'insuline, son récepteur, le *heat shock protein 65* (HSP65) et le *glutamic acid decarboxylase* (GAD) [9, 10].

Figure 2 : Structure de la proinsuline et de l'insuline



Dans la *voie directe*, les auto-antigènes, présentés à la surface des cellules β par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, sont reconnus par des lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ (CTL). Cette reconnaissance déclenchera une cascade de signaux transducteurs menant à la mort spécifique des cellules β et ce par apoptose via les voies FAS/FASL et la sécrétion de cytotoxines (granzymes et perforines) [11-13].

Lors de la *reconnaissance indirecte*, les cellules T $CD4^+$ reconnaissent des peptides d'un auto-antigène des cellules β présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, nommé HLA chez l'humain, des cellules nommées présentatrices d'antigènes (APC) [9]. Suite à ce signal 'danger', la cellule T effectrice $CD4^+$ s'activera seulement si plusieurs autres signaux sont présents comme la reconnaissance du peptide par le complexe du récepteur de la cellule T (TCR) et du CD3, de la co-activation par la liaison des molécules B7 et CD28 et de l'action de diverses cytokines (IL-1, IFN- α , IFN- β) produites par l'APC. Par la production d'interleukine-2 (IL-2), d'IFN- γ et de TNF- β de la sous-population T_H1 des lymphocytes $CD4^+$, il y aura activation des CTL. Ces dernières sécrèteront diverses molécules, comme l'IFN- γ , le TNF- β et des cytotoxines, qui endommageront les cellules β pancréatiques [14, 15] et entraîneront leur mort majoritairement par une apoptose régulée par des facteurs de transcription comme NF κ B et STAT-1 [16-18].

Dans les deux cas, cette infiltration de CTL, de macrophages et de cellules dendritiques est appelée insulite et décrit l'inflammation des îlots [19]. Cette étape sera marquée par une sécrétion importante de cytokines, comme les interleukines (IL) 3, 4, 5, 10 et 13 par la sous-population T_H2 des cellules T $CD4^+$, qui activeront les cellules B en plasmocytes et permettront la sécrétion d'auto-anticorps [15]. Ceux-ci sont présents dans 90% des cas plusieurs mois ou années avant le développement de la maladie [11, 20]. L'amplification de l'insulite surviendrait par la sécrétion de chémokines connues pour attirer les macrophages, comme le CCL2, CCL7 et CCL20, par les cellules β [21-23]. Celles-ci seraient stimulées davantage par les cytokines produites par les macrophages activés, les cellules T et NK [16, 24]. Par la suite, les macrophages, attirés au pancréas et activés par la production d'IFN- γ des cellules T_H et T_C , seront responsables d'une partie de la destruction des cellules β par leur production des cytokines IL-1 β , TNF- α , IFN- γ et de radicaux libres (O_2^- , H_2O_2 , NO) [19, 25-27].

Un cercle vicieux s'en suivra : les antigènes relâchés par les cellules β apoptotiques serviront à potentialiser le système immunitaire. Dans ce cas, les lymphocytes T seront stimulés par la présentation croisée de ces antigènes spécifiques aux cellules β . De plus, il a été démontré que la voie de la caspase 3, un élément central du mécanisme de l'apoptose, était directement impliquée dans la mort des cellules β [28]. Ceci fut mis en évidence par un modèle de souris exemptes de caspase 3 (Casp3 $^{-/-}$) qui ne développaient pas la maladie suite à de multiples doses de streptozotocine; cette dernière connue pour induire le diabète de type 1 par des dommages à l'ADN spécifiquement dans les cellules β dus à la production d'oxyde nitrique [29]. De plus, aucune infiltration lymphocytaire au niveau des îlots pancréatiques n'était présente dans ce modèle Casp3 $^{-/-}$. Ceci permet de conclure que la caspase 3 est essentielle pour activer le système immunitaire au niveau des îlots et que cette étape est un événement clé dans le développement du diabète de type 1 [28].

A.2.2 Causes

Le diabète de type 1 est une maladie complexe pour laquelle plusieurs causes peuvent être possibles. Cependant, les facteurs environnementaux et génétiques ont été identifiés comme étant les agents déclencheurs principaux de la maladie. Il a été de plus démontré que les facteurs génétiques ne pouvaient être la seule cause de l'étiologie du diabète en raison d'une concordance de 50% de la maladie chez les jumeaux homozygotes [30]; impliquant d'avantage de responsabilité de l'environnement.

A.2.2.1 Facteurs environnementaux

A.2.2.1.1 Alimentation

Dans une étude effectuée sur une population d'origine italienne, trois facteurs extrinsèques potentiellement responsables du développement de la maladie ont été identifiés : un plus grand nombre de maladies infectieuses chez la mère enceinte, de l'eczéma et une courte période d'allaitement, moindre que trois mois, durant la période néonatale du poupon [31]. Cette dernière cause, très controversée [32], serait expliquée par un rôle protecteur du lait maternel contre les entérovirus [33]. Une hypothèse, datant du début des années 1980, suggérait que l'utilisation du lait d'origine animale, dans les trois premiers mois de naissance, pouvait susciter une réaction immunitaire contre l'insuline animale. En fait, il est expliqué que le lait maternel, qui contient des facteurs de croissance, des cytokines et des facteurs modulant l'immunité du nouveau-né, était essentiel pour bâtir la barrière immunologique de l'intestin [34, 35]. Il a été également proposé qu'une exposition rapide aux protéines animales ou un allaitement maternel raccourci causerait une tolérance déficiente aux auto-antigènes pancréatiques et un transfert passif inadéquat de l'immunité maternelle [36]. Le mécanisme proposé expliquant l'activation des lymphocytes T serait un mimétisme moléculaire

('molecular mimicry') par une réaction croisée entre les protéines laitières bovines, essentiellement l'insuline, et les auto-antigènes des îlots [37]; causant une incidence accentuée au diabète de type 1 [36].

A.2.2.1.2 Virus

Plusieurs études épidémiologiques ont également mis en évidence des influences directes avec l'incidence du diabète de type 1 avec une infection aux entérovirus [38] et la première apparition des auto-anticorps [39, 40]. Par exemple, le virus Coxsackie B a été isolé dans plusieurs cas de diabète infantile mortel [41]. Une étude explique que la souche Coxsackie B4 occasionne des dommages locaux spécifiques aux tissus plutôt que d'activer les lymphocytes T par une reconnaissance de protéines des îlots chez des souris susceptibles à la maladie [42]. Ce même mécanisme est utilisé chez l'humain par les virus Cox. B3 et B4, Mumps et le réovirus de type 3 [41, 43-45]. Les rotavirus, pour leur part, seraient diabétogéniques en raison d'une réaction de mimétisme moléculaire avec l'auto-antigène de la tyrosine phosphatase IA-2 [46].

Il existe également certains composés chimiques qui sont connus pour être diabétogéniques chez les rongeurs comme l'alloxan, la streptozotocine, le chlorozotocin, le cyproheptadine et le vacor chez l'humain. Ceux-ci fonctionnent majoritairement par la génération de radicaux libres, par la destruction de l'ADN ou l'inhibition du transport actif de calcium [47]. Plusieurs cas d'empoisonnement au vacor ont été dénombrés en Corée et aux États-Unis durant les années 80 et tous les patients développaient le diabète de type 1 [48]. De plus, il a été remarqué qu'il y avait présence d'auto-anticorps dirigés contre les antigènes des cellules des îlots; cependant différents de ceux détectés chez des diabétiques de type 1 développant la maladie de façon intrinsèque [49].

A.2.2.2 Facteurs génétiques

Le facteur génétique est cependant le plus étudié comme cause du diabète insulino-dépendant. Grâce à la technique d'analyse génotypique d'association de l'ADN ('mapping') faite chez un grand nombre d'individus diabétiques, plusieurs gènes candidats ont été identifiés et dans certains cas, les polymorphismes de nucléotides (SNPs) directement concernés. Par exemple, trois gènes encodés dans le loci du CMH de classe 2 chez l'humain sont directement impliqués dans le diabète de type 1 : la région promotrice du gène de l'insuline [50] ainsi que les régions codantes des gènes *CTLA4* [51] et *PTPN22* [52-54]. Plus récemment, le gène *CD25*, encodant la chaîne α du récepteur de l'IL-2, a également été identifié [55] ainsi que celui du *IFIH1* [56, 57] et du *CLEC16A* [56, 58]. Il est également connu que les polymorphismes sur le locus du HLA, chromosome 6p21, sont essentiels pour développer la maladie car ils comptent pour environ la moitié des polymorphismes rencontrés. Cependant, ils ne sont insuffisants à son déclenchement. En fait, une dérégulation de la fonction immunitaire est également nécessaire [59].

En raison d'un grand nombre de caractéristiques génétiques et physiologiques communes avec le diabète de type 1 humain, le modèle murin NOD (nonobese diabetic) est le plus utilisé [60]. Le rat BB représente également un autre modèle de cette maladie chez les rongeurs. En fait, différentes études ont permis de faire la lumière sur les gènes candidats susceptibles à la maladie. Ces derniers sont localisés sur différents locus nommés Idd (insulin-dependent diabetes genes) et portent chacun un numéro distinct allant de 1 à 24. De plus, ils ont différentes fonctions dans le système immunitaire comme la présentation de l'antigène (Idd 1, 13 et 14), la réponse des cellules T (Idd 9.1), les réponses inflammatoires (Idd 4) et plusieurs autres [60].

A.3 Solutions actuelles

A.3.1 Utilisation d'insuline exogène

Les moyens actuels de traitement du diabète de type 1 consistent à des injections régulières d'insuline, à la pratique d'une activité physique fréquente et à une alimentation restreinte en glucose. Il a été démontré qu'une meilleure forme physique prédit un contrôle plus adéquat de la glycémie et du cholestérol chez les adolescents diabétiques [61]. Plusieurs études ont également établi qu'un meilleur contrôle de la glycémie, un régime strict et une thérapie appropriée avec de l'insuline diminue l'occurrence et la progression des complications reliées à la maladie [62].




Il existe trois catégories d'insuline différentes sur le marché canadien : insuline exogène , analogue  ou insuline prémélangée . Chacune est classée selon son délai d'action (voir **Tableau II**).

Tableau II : *Différentes catégories d'insuline vendue au Canada ainsi que leur délai d'action, activité maximale et temps d'action respectifs*

Catégories d'insuline	Délai d'action	Activité maximale	Temps d'action	Marques commerciales
Action Rapide	30 min	2 à 3 h	6.5 h	Humulin®-R Novolin®ge Toronto
Semilente	1 à 3 h	5 à 8 h	≤ 18 h	Humulin®-N Novolin®ge NPH
Action Prolongée	3 à 4 h	8 à 15 h	-	Humulin®-U

Analogue à Action Rapide	10 à 15 min	60 à 90 min	3 à 5 h	Humalog® NovoRapid® Apidra®
Analogue à très longue durée d'action	90 min	aucune	≤ 24 h	Lantus® Levemir®
Insulines prémélangées				Humalog®Mix25 MC
Proportion fixe d'insuline à action rapide et semilente				Humulin® (20/80, 30/70) NovoMix 30

adapté de la référence [63]

Plus récemment, les implantations d'îlots de Langerhans non-encapsulés et encapsulés furent développées afin de remédier à la prise journalière d'insuline permettant ainsi un contrôle plus adéquat et physiologique de la glycémie (voir section **A.3.2**).

A.3.2 Implantation d'îlots de Langerhans

La transplantation de pancréas, généralement de donneurs cadavériques, débuta en 1966 avec un succès faible de transplantation et de survie des patients [64]. Cependant, avec la découverte des immunosuppresseurs et de nouvelles techniques chirurgicales, le nombre international de transplantations pancréatiques s'est élevé à environ 11 000 cas à la fin de l'année 1998 [65]. Cependant, plusieurs risques restent présents ; complications cliniques, infections bactériennes

ou virales, abcès, thrombose, qui expliquent un taux de mortalité postopératoire de 7% [65, 66].

A.3.2.1 Îlots non-encapsulés

La transplantation d'îlots, contrairement à celle de pancréas entier, est utilisée car elle est moins dangereuse, moins invasive, en raison d'une masse moins importante à transplanter [67], et plus abordable. Il est également possible d'utiliser la cryopréservation pour entreposer les îlots de donneurs et ainsi faciliter leur disponibilité. En fait, les îlots représentent seulement 1% de la masse du pancréas et sont distribués de façon aléatoire.

A.3.2.1.1 Résultats de la transplantation d'îlots non-encapsulés

C'est en 1972 que M. Paul E. Lacy a isolé pour la première fois, avec l'enzyme collagénase, des îlots de rat [68]. En 1990, son groupe obtint une indépendance à l'insuline d'un mois chez des sujets diabétiques transplantés. Ils présumèrent que l'échec était causé par un rejet du greffon [69]. Durant les années suivantes, selon les données recueillies par le Registre International de Transplantation d'Îlots, 6% des diabétiques de type 1 transplantés réussissaient à éliminer leur utilisation d'insuline pour plus d'un an [70]. Par la suite, en 2000, le protocole d'Edmonton permit le maintien d'une indépendance à l'insuline chez sept patients pour une durée variant de trois mois à un an [71]. Cependant, le même groupe obtint, en 2005, une indépendance de 67% six mois après la dernière transplantation d'îlots et ce chiffre diminua à 58% six mois plus tard [72]. Un an plus tard, une étude internationale fut conduite afin d'évaluer la reproductivité du protocole d'Edmonton. Ainsi, ils rapportèrent une indépendance d'un an suivant la dernière implantation chez 44% des sujets alors que 28% utilisaient de façon

modérée l'insuline en raison d'une fonction partielle du greffon et 28% des patients avaient perdu totalement la fonction de leur implant [73].

A.3.2.1.2 Limitations de la transplantation d'îlots non-encapsulés

Les obstacles principaux à cette chirurgie sont la disponibilité des îlots et le maintien de leurs fonctions. Ceci est expliqué par l'incapacité des îlots à proliférer et leur possibilité à créer un centre nécrotique causé par un manque d'oxygène et de nutriments [67]. Ces succès sont également limités par une perte initiale de viabilité du greffon d'environ 50-70% lors de son isolation [74], une réponse inflammatoire au site de transplantation, une réaction auto-immune et une toxicité induite par l'utilisation des drogues immunosuppressives [75, 76].

A.3.2.2 Îlots encapsulés

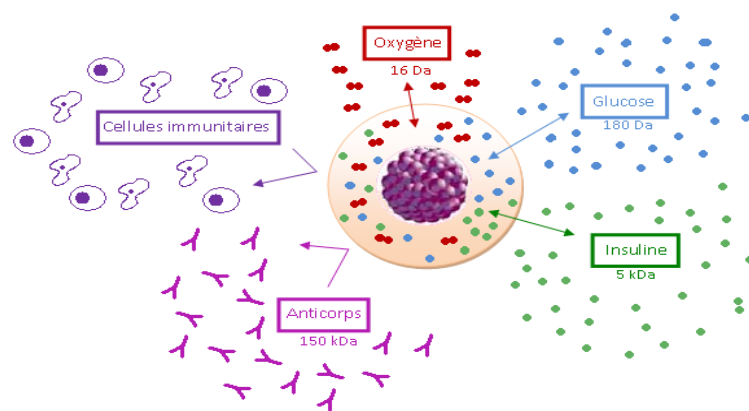
A.3.2.2.1 Concept d'immunoisolement

L'immunoisolement consiste à fournir une barrière physique capable d'empêcher l'éventuelle reconnaissance du transplant par le système immunitaire de l'hôte. En fait, la microcapsule, qui mesure entre 200 et 900 μm de diamètre, empêche l'entrée des molécules de haut poids moléculaire comme les cellules du système immunitaire et les anticorps (150 kDa). Cependant, son treillis moléculaire (30-50 kDa) permet l'entrée de petites molécules comme l'oxygène (16 Da), le glucose (180 Da) et l'insuline (5 kDa).

L'idée de transplanter des cellules encapsulées débuta en 1933. À ce moment, Bisceglie imagina un moyen de remplacer le pancréas par des cellules productrices d'insuline et de les transplanter suite à leur encapsulation. Ce concept lui permit d'étudier les effets de l'absence de vascularisation sur la survie du tissu encapsulé [77]. Par la suite, l'idée d'immunoisolation fut introduite en 1943 par Algire qui remarqua que l'encapsulation, ainsi que la biocompatibilité de la capsule,

retardait l'éventuel échec du greffon [78]. En 1964, T.M.S. Chang imagina un moyen de protéger les cellules transplantées par une microcapsule composée d'une membrane ultramince de polymères [79]. Ce n'est cependant qu'en 1980 que la notion de membrane semi-perméable a été décrite pour la première fois par Lim and Sun [80].

Figure 3 : Concept d'immunoisolement d'un îlot de Langerhans encapsulé



A.3.2.2.2 Différentes géométries pour l'immunoisolement

Il existe trois types majeurs différents d'encapsulation qui ont été étudiés : les macrocapsules intravasculaires, extravasculaires et les microcapsules.

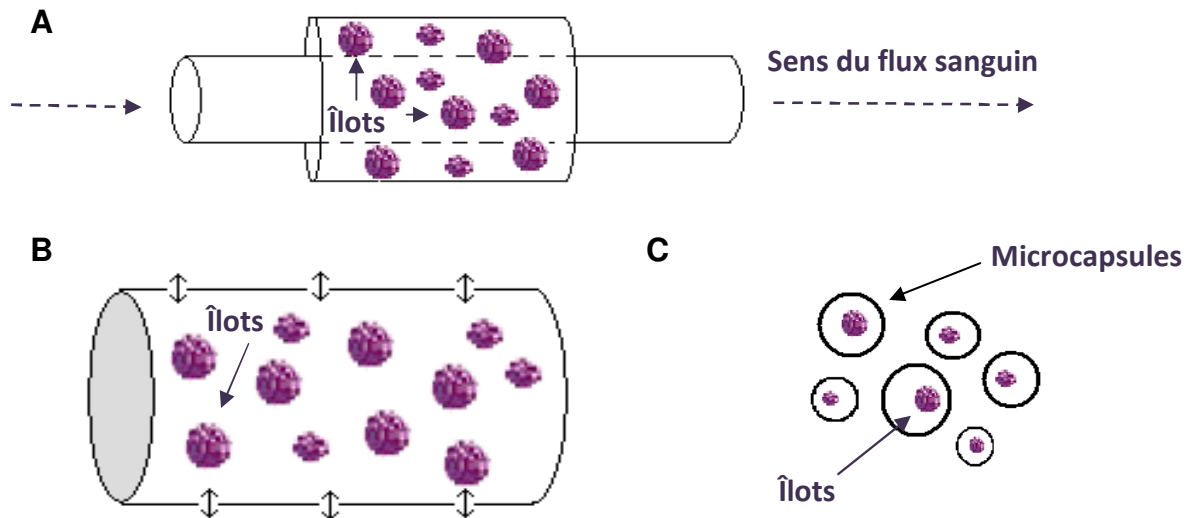
Premièrement, les *macrocapsules intravasculaires* consistent à recréer l'environnement initial vascularisé des îlots (**Figure 4-A**). En fait, cet arrangement procure un apport suffisant d'oxygène et de nutriments et permet également un contrôle adéquat des fluctuations du glucose sanguin [81]. Ces macrocapsules consistent en un tube microporeux où le flux sanguin est dirigé au centre du tube et où les cellules transplantées sont regroupées dans une membrane externe juxtaposée [82, 83]. Un des problèmes majeurs à ce dispositif est la thrombose localisée aux sites d'anastomose. Ceci induit inévitablement une diminution du flux sanguin, la mort des îlots transplantés et un retour de la maladie [81]. L'utilisation

d'anticoagulants permet d'éviter cet obstacle et de normaliser la glycémie chez des rats [84], des chiens [85] et des singes [84] durant quelques heures. Cependant, la formation d'un thrombus reste un problème majeur pour les macrocapsules intravasculaires.

Les *macrocapsules extravasculaires* sont utilisées car elles nécessitent qu'une légère chirurgie, n'ont aucun besoin d'être anastomosées, peuvent être retrouvées et enlevées facilement et sont produites de façon simple [86] (**Figure 4-B**). Elles sont généralement implantées, chez les modèles animaux, dans la cavité péritonéale [87-89], l'espace sous-cutané [90-92] ou dans la capsule rénale [93]. Ce type de dispositif consiste en une 'fibre creuse' pourvue d'une surface lisse. Celle-ci permet de diminuer les réactions immunitaires et fibrotiques [94]. En 1999, le groupe de Jain *et al.* ont réussi, grâce à ce type de macrocapsules, à obtenir une normoglycémie de 200 jours chez des rats BB transplantés avec des îlots de porc encapsulés [89]. Cependant, certains problèmes de biocompatibilité subsistent avec ce type de macrocapsules et dans certains cas, la quantité d'îlots que peuvent contenir ces dispositifs n'est pas suffisante.

Les *microcapsules* sont définies comme étant l'encapsulation, dans une microsphère, d'un petit groupe de cellules (**Figure 4-C**). Elles permettent une meilleure diffusion des nutriments, du glucose et de l'oxygène par un ratio surface/volume plus avantageux. Ce nouveau concept permet entre autre d'augmenter la survie des cellules encapsulées [95] et de favoriser une réponse plus rapide aux fluctuations glycémiques [96]. De plus, elles sont difficiles à détruire, sont mécaniquement stables [97], ont un coût de production faible et peuvent être implantées en une seule injection [86]. Cependant, contrairement aux macrocapsules, elles sont difficiles à extraire en cas de problèmes [67].

Figure 4 : Trois types d'encapsulation différents. **A.** Macrocapsules intravasculaires, **B.** Macrocapsules extravasculaires, **C.** Microcapsules



adaptée de [67, 81, 98]

A.3.2.2.3 Succès de la transplantation d'îlots microencapsulés

En 1992, le groupe de Sun réussit à normaliser la glycémie chez des souris diabétiques induites à la streptozotocine (STZ) pour 10 mois avec l'aide d'îlots de rats encapsulés dans des microcapsules d'alginate [99]. Cette réussite fut également constatée chez de plus gros modèle, comme le singe [100] et le chien [101], pour une période de 150 jours et deux ans respectivement. Chez le rat diabétique induit au STZ, la période de stabilité s'étend de cinq à 16 semaines vers la fin des années 1990. [102, 103]. Plus récemment, un groupe des États-Unis obtint une normoglycémie de plus d'un an chez des souris NOD avec l'utilisation d'immunosuppresseurs [104]. Malgré ces différents succès, les microcapsules sont encore sujettes à la fibrose et à la reconnaissance immunitaire en raison d'une biocompatibilité déficiente.

Il a également été démontré, par le groupe de Korbitt, que la capsule pouvait avoir un rôle direct sur la survie de l'îlot encapsulé. En fait, ils prouvèrent

que cette encapsulation améliorerait la viabilité et fonction des îlots *in vitro* et que leur utilisation *in vivo* permettait de restaurer mieux la glycémie de souris diabétiques. De plus, une quantité moindre d'îlots encapsulés fut nécessaire pour obtenir une glycémie comparable aux îlots implantés libres [105].

A.3.2.2.4 Biomatériaux pour la microencapsulation

Plusieurs matériaux ont été investigués afin de construire la microcapsule optimale : comme l'agarose [106], le polyéthylène glycol (PEG) [107] et le poly(hydroxyethylmetacrylate-méthylmethacrylate) (HEMA-MMA) [108].

Cependant, ce sont les hydrogels qui ont été le plus fréquemment utilisés en raison de leur caractère souple qui réduit les frictions mécaniques des capsules [109]. Ils sont également perméables aux nutriments de petit poids moléculaire et aux métabolites [109]. Le plus étudié pour la thérapie cellulaire est sans aucun doute l'alginate. Celui-ci est un polysaccharide anionique extrait d'algues marines qui est unique par sa biocompatibilité, sa capacité à se complexer à d'autres polymères et sa facilité à se transformer en gel très rapidement dans des conditions physiologiques [110, 111].

L'alginate est composé de différentes chaînes d'acide de β -L-guloniques (G) et α -D-mannuroniques (M) [112] qui peuvent se retrouver soit en une série de G (bloc G), de M (bloc M) ou en alternance de M et G (bloc MG). Il est également connu qu'un ratio M/G faible donne une capsule plus solide. Ceci permet entre autre d'augmenter sa résistance mécanique et sa durabilité. Inversement, un ratio M/G plus élevé permet d'obtenir une capsule plus souple, donc plus flexible. De plus, certaines études ont démontré un rôle de la proportion d'acides M et G dans la biocompatibilité de l'alginate. Il a été remarqué qu'un alginate comportant un grand nombre d'acides mannuroniques (> 35%) peut stimuler les macrophages et les lymphocytes [113], tandis qu'un grand nombre d'acides guloniques est

rapporté comme étant moins immunogénique [114-117]. Cependant, certaines de ces expériences furent conduites avec de l'alginate non-purifié. Ainsi, les différents contaminants présents dans ces alginates peuvent expliquer les grandes réactions immunitaires obtenues. De plus, certains groupes obtinrent même des résultats inverses concernant le lien entre la quantité d'acides M et G et la réaction immunitaire induite [118-120].

Figure 5 : Structure des acides mannuroniques (M) et guluroniques (G)



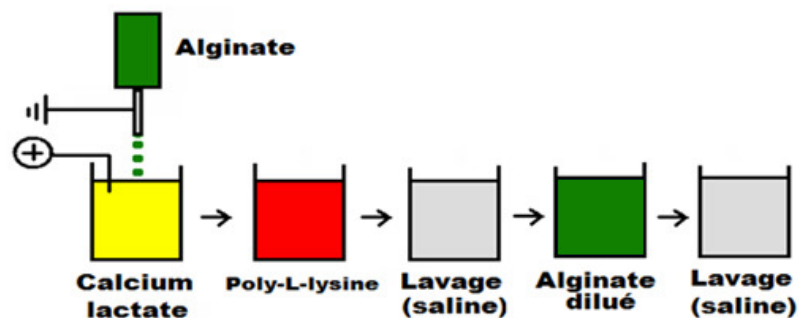
adaptée de [121] et [122]

L'encapsulation consiste à l'emprisonnement des cellules dans une gouttelette d'alginate. Celle-ci sera ensuite gélifiée rapidement par l'interaction directe des blocs G de l'alginate avec des cations divalents, généralement du calcium ou du baryum (Ca_2^+ , Ba_2^+), présents dans la solution de gélification. Cette étape permettra également à la bille de garder sa forme sphérique. Plus spécifiquement, les gouttes d'alginate seront formées par extrusion à l'aide d'une aiguille poussée mécaniquement par une pompe électrique. Il existe trois méthodes différentes: jet d'air [123], vibration [124] ou différence de potentiel entre l'aiguille et la solution gélifiante. Cette dernière méthode, utilisée dans notre laboratoire, consiste à détacher la goutte d'alginate par une impulsion créée à l'aide d'un générateur d'ondes électrostatiques. L'étape suivante consiste à diminuer la perméabilité membranaire de la capsule en ajoutant une seconde

membrane. Celle-ci sera formée par la complexion de la surface de la bille, de charge négative, avec un polyélectrolyte de charge opposée. Celui-ci, généralement la poly-L-lysine (PLL) ou la poly-L-ornithine (PLO) [125], permet également d'améliorer la stabilité mécanique et chimique des microcapsules. Finalement, lorsque la membrane de PLL est utilisée, la capsule doit être plongée dans une solution d'alginate diluée afin de neutraliser les charges présentes à sa surface [126]. Ceci permet d'augmenter la biocompatibilité de la microcapsule en camouflant la PLL qui est connue pour induire des réactions immunitaires et de la fibrose [127, 128].

L'utilisation d'une différence de voltage pour générer des gouttes d'alginate permet la formation de billes de plus petites tailles qui favorisera une meilleure diffusion de l'oxygène et nutriments, une meilleure résistance mécanique et un plus grand nombre d'accès à des sites de transplantations (i.e. cavité péritonéale, capsule rénale). Ceci est expliqué par un volume de l'implant plus petit.

Figure 6 : *Formation d'une microcapsule d'alginate-PLL-alginate (APA) à l'aide d'une différence de potentiel*



adaptée de [86] et [129]

Les encapsulations décrites dans les études **D.1** et **D.2** excluent les incubations dans la PLL et l'alginate dilué. Ce modèle a été utilisé afin d'éviter les

effets néfastes connus de la PLL dans la stimulation des cellules immunitaires et la production de cytokines inflammatoires par ces dernières [127]. Les îlots encapsulés ont donc été emprisonnés dans une bille d'alginate seulement; celle-ci permettant avec succès l'encapsulation des cellules.

A.3.2.2.4.1 Sites de transplantation

La cavité péritonéale est le site de transplantation le plus utilisé à ce jour en raison d'un espace d'implantation relativement spacieux [130], facile d'accès et pratique pour récupérer les capsules à des fins d'analyse. Les principaux désavantages du péritoine sont une vascularisation inadéquate, une concentration faible en oxygène et une population cellulaire majoritairement composée de macrophages. De plus, cette région est associée à de graves réactions immunitaires (i.e. fibrose et production de cytokines) [131, 132]. Plusieurs autres régions furent également investiguées; foie [133-135], rate [136-139], capsule rénale [140-143] et espace sous-cutané [90, 92, 144, 145]; mais aucune n'est jugée encore à ce jour comme le site idéal pour la transplantation d'îlots de Langerhans.

A.4 Problématique

Une survie limitée du transplant correspond à un problème majeur de l'encapsulation et peut même expliquer différents échecs. Deux obstacles responsables de cette diminution de survie seront discutés: la biocompatibilité déficiente du biomatériau utilisé (i.e. alginate) et les effets du retrait du transplant de son environnement naturel.

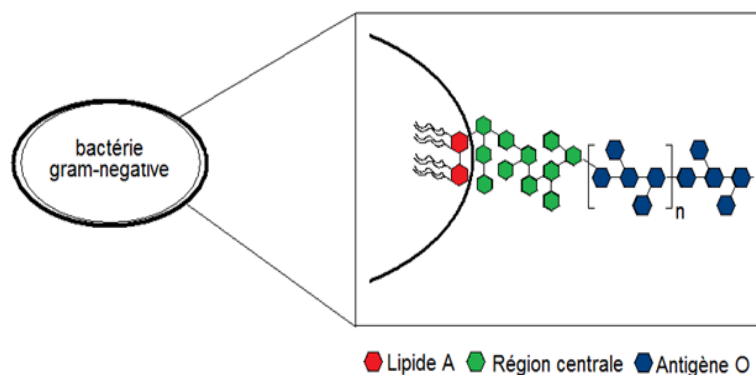
A.4.1 Biocompatibilité

A.4.1.1 Réactions immunitaires contre les microcapsules

Tel que mentionné précédemment, les microcapsules ne sont pas suffisamment biocompatibles avec l'hôte. Il est connu que la plupart des alginates vendus commercialement peuvent provoquer une fibrose péri capsulaire et une adsorption non-spécifique de protéines [109, 146-148]. Ceci est causé par une stimulation des lymphocytes et fibroblastes et une production de cytokines pro-inflammatoires [113, 149-151]. Notre groupe a identifié plus spécifiquement les cellules impliquées (i.e. macrophages et lymphocytes) et certaines cytokines, TGF- β 1, IL-1 β et TNF- α , comme étant responsables des réactions de l'hôte contre les microcapsules [152]. Les effets majeurs à long terme sont la mort des cellules encapsulées par nécrose [153] et un échec de la transplantation.

Il est connu que l'alginate non purifié contient bon nombre de contaminants. Premièrement, les polyphénols sont connus pour susciter de vives réactions immunitaires et pour modifier la viscosité de l'alginate par dépolymérisation. Les endotoxines (pyrogènes), produites par les bactéries gram-négatives, représentent la partie externe du lipopolysaccharide (LPS) et sont connues pour induire des réactions inflammatoires. Lorsqu'il est relâché dans la circulation, le LPS peut activer les lymphocytes et les cellules endothéliales qui à leur tour sécrèteront des cytokines, de l'oxyde nitrique et des facteurs tissulaires [154]. Magalhaes *et al.* stipule que les endotoxines ne peuvent agir directement sur les cellules et les affecter [155]. Cependant, il a été prouvé que le LPS peut affecter directement la survie et sécrétion d'insuline d'îlots fraîchement isolés [156-159]. Il a également été démontré que certaines protéines, présentes dans différents implants biomédicaux, étaient responsables des réactions immunitaires contre ces derniers [160, 161]. Plus récemment, notre laboratoire confirma les effets des protéines de l'alginate dans les diverses réactions immunitaires dirigées contre la capsule [162].

Figure 7 : Structure chimique principale des endotoxines



adaptée de [163]

A.4.1.2 Méthodes de purification

L'alginate vendu commercialement est connu pour contenir des impuretés naturelles mitogéniques mais également des composés bactériens [164]; ce qui explique que plusieurs protocoles de purification virent le jour. Le groupe de Zimmerman utilisèrent le principe d'électrophorèse ('free flow electrophoresis', FFE) afin d'extraire les différents contaminants. Ceci leur permit de diminuer considérablement les réactions péricapsulaires *in vivo* et l'activation de splénocytes *in vitro* [115]. Pour sa part, Klock purifia l'alginate grâce à un protocole utilisant différents produits chimiques [165] tandis que Prokop *et al.* l'utilisèrent tout en l'allégeant [166]. Dans la même année, de Vos s'employa à changer le pH de l'alginate à plusieurs reprises pour le purifier et ce dernier protocole permit d'obtenir un pourcentage beaucoup plus faible (i.e. 2 – 10%) de capsules présentant de la fibrose capsulaire. Cette amélioration permit même de doubler le temps de survie des cellules encapsulées [103].

Beaucoup de protocoles étaient utilisés et aucun n'était jugé satisfaisant. En fait, Tam *et al.* prouvèrent, par une 'X-ray photoelectron spectroscopy' (XPS), que l'alginate commerciale, ainsi que celui purifié selon des méthodes connues,

contenaient encore des traces de contaminants [167]. Dans des études réalisées dans notre laboratoire, différentes méthodes publiées furent comparées en portant une attention particulière aux différents contaminants présents [168]. Les endotoxines et polyphénols s'avérèrent efficacement éliminés tandis que les protéines présentes ne semblaient pas être affectées. Plus récemment, notre équipe réussit avec succès à diminuer encore plus ces contaminants protéiques [162]. Ce dernier protocole servira à purifier l'alginate utilisé lors des encapsulations des deux études présentées (voir **D.1** et **D.2**).

Toutes ces études ont permis de prouver que les purifications augmentaient la biocompatibilité avec l'hôte des capsules. Cependant, aucune étude précise n'avait été conduite à ce jour afin de déterminer concrètement des effets directs des contaminants sur les îlots encapsulés. Le premier article présenté (voir **D.1**) évaluera les effets directs des contaminants sur la survie et fonction d'îlots de Langerhans encapsulés lorsque de l'alginate non-purifié ou purifié est utilisé.

A.4.2 Co-encapsulation des îlots et cellules canaliculaires

La survie des îlots encapsulés est compromise lors de leur isolation, de leur encapsulation (discuté précédemment) et de leur culture post-encapsulation. En fait, ces différentes étapes sont directement responsables d'une diminution marquée de la viabilité du greffon et influencent le nombre d'îlots nécessaires à transplanter. Ainsi, différents moyens ont été imaginés afin d'améliorer la survie et fonction des îlots suite à leur isolation.

A.4.2.1 Effets de l'isolation

Il a été prouvé qu'un stress cellulaire, généré par la perte du support trophique ou un élément cytotoxique, peut activer les voies pro-apoptotiques JNK et p38 [169, 170]. De plus, il a été prouvé que lors de l'isolation des îlots de Langerhans, ces voies, ainsi que PARP-1, étaient activées [171-173] tandis que les voies ERK 1 et 2 étaient diminuées [174]. En 2000, Paraskevas *et al.* conclurent qu'un lien existait entre l'échec de la transplantation d'îlots et la mort de ceux-ci par apoptose suite à leur isolation [175]. Ainsi, la perte du support trophique est occasionnée entre autre par la disruption mécanique des îlots, d'un endommagement de leurs liens avec la matrice extracellulaire ou de la perte d'accessibilité à l'oxygène et aux nutriments.

Les îlots, composés des cellules α , β , δ , ϵ et PP (voir **Figure 1**), sont entourés du pancréas exocrine, de cellules canaliculaires, de nerfs et de vaisseaux sanguins. Les liaisons cellule-cellule et cellules-matrice sont les principaux liens dans l'îlot et prédominent dans l'environnement périinsulaire [176]. De plus, il est connu que le collagène joue un rôle majeur dans les liaisons avec le pancréas exocrine et qu'il existe cinq types différents dans l'environnement immédiat de l'îlot: I, III, IV, V et VI [176, 177]. Ceci explique l'emploi de l'enzyme collagénase lors de l'isolation des îlots. Cette étape est également accompagnée d'une disruption mécanique du pancréas. Avec le temps, plusieurs protocoles ont été imaginés afin de maximiser le nombre d'îlots isolés mais également de diminuer l'impact de cette étape; par exemple, l'utilisation du Ficoll pour purifier les îlots [178] et la distension du cholédoque avant la digestion enzymatique [179].

L'isolation peut également compromettre l'intégrité des molécules de la matrice extracellulaire [180] qui servent à la formation de l'îlot [181] mais également qui peuvent jouer un rôle dans sa survie et fonction [182-187]. En fait, il est connu que l'isolation détruit la membrane périinsulaire de l'îlot et diminue l'expression des intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$ et αV [188]. À partir de ces observations,

plusieurs groupes obtinrent une survie prolongée lorsque les îlots [189], ou des couches unicellulaires de cellules β [190, 191], étaient cultivés sur des pétris recouverts de macromolécules de la matrice extracellulaire. Il y a également un groupe des États-Unis qui réussit à préserver la survie, à réduire l'apoptose et à augmenter la sécrétion d'insuline de cellules β encapsulées à l'aide de séquences dérivées de laminines et du collagène de type I. Celles-ci étaient photopolymérisées sur l'hydrogel PEG servant de capsule [192]. En 2008, ils réussirent à améliorer la survie et la sécrétion d'insuline de cellules β encapsulées mais cette fois-ci dans des capsules de PEG contenant certaines protéines de la matrice extracellulaire : collagène de type I et IV, fibrinogène, fibronectine, laminine et vitronectine [193].

Finalement, l'isolation dissocia les îlots de leurs nerfs et vaisseaux sanguins et ceux-ci ne seront pas régénérés suite à l'encapsulation [194, 195]. De cette façon, les îlots n'obtiendront pas le même apport en nutriments et oxygène. Cet état entraînera les îlots à diminuer leurs activités nécessitant beaucoup d'adénosine triphosphate (ATP) mais également à sécréter des radicaux libres [196]. Ceux-ci seront potentiellement dangereux pour les îlots eux-mêmes en endommageant leur ADN, protéines et/ou lipides [197]. L'oxygénation et la survie des îlots peuvent être améliorées par l'utilisation du perfluorocarbène (PFC) [198]. Celui-ci, composé majoritairement de fluorine, permet un plus grand transport et dissolution de l'oxygène [199]. Plus récemment, des études ont été menées sur les agrégats de cellules d'îlots. En fait, le groupe d'Halban *et al.* décrivent une technique qui permet à des cellules d'îlot dispersées de se reformer en réagrégats d'environ 100 μm [200]. Ceci permettrait d'éviter la formation de centre nécrotique puisqu'il est assumé que l'oxygène est consommé dans les premiers 150 μm de l'îlot. De plus, des études ont prouvé que les petits îlots étaient plus adaptés à survivre dans des environnements faibles en oxygène et qu'ils avaient un meilleur pronostic en terme de transplantation [201, 202]. Une troisième méthode a été étudiée; celle de l'utilisation d'îlots de Tilapia. Ceux-ci, nommés 'Brockmann

bodies', ont également été proposés comme source d'îlots résistants à l'hypoxie [203]. Cette hypothèse se base sur le fait que cette sorte de poisson vit exclusivement dans des eaux stagnantes où le pourcentage d'oxygène est faible. De plus, le groupe de Wright *et al.* investiga un moyen d'utiliser la thérapie génique afin que ces îlots de poisson puissent exprimer l'insuline humaine [204].

A.4.2.2 Utilisation de cellules non pancréatiques

Plusieurs types cellulaires ont été investigués afin d'améliorer la survie d'îlots de Langerhans isolés: les cellules de Sertoli, les érythrocytes ou la sous-muqueuse du petit intestin.

En fait, les cellules de Sertoli, exprimées dans les testicules, sont soupçonnées d'être responsables de l'immunoprotection du site testiculaire [205, 206]. Ceci est expliqué par leur production du facteur Fas ligand (Fas-L) [207] qui est connu, par son interaction avec Fas (CD95 ou Apo1), pour induire l'apoptose des lymphocytes et ainsi diminuer la réponse immunitaire [208, 209]. Plusieurs études *in vivo* d'îlots transplantés [206] ou co-encapsulés avec des cellules de Sertoli [210, 211] montrèrent une amélioration de la survie du transplant et même une plus longue durée de normoglycémie [212]. Une étude xénogénique (i.e. îlots de poissons transplantés chez des souris) démontra également le même point et proposa un rôle d'immunosuppression locale des cellules de Sertoli [213]. Cependant, ce même groupe prouva que Fas ligand n'était pas responsable de l'immunoprotection des îlots lorsqu'ils étaient co-encapsulés avec des cellules de Sertoli [214]. Les cellules de Sertoli peuvent également sécréter des facteurs de croissance comme l'insulin-like growth factor I et II (IGF-1 et IGF-II), le transforming growth factor (TGF- α) et l'endothelial growth factor (EGF); qui sont connus pour favoriser la survie de l'îlot [215]. Ces cellules n'ont pas été étudiées avec des îlots encapsulés en raison de leur fonction principale (i.e. protection

immunitaire du greffon) déjà jouée par la microcapsule. Ainsi, la capsule 'parfaite' sera inévitablement capable d'empêcher la reconnaissance de l'implant par le système immunitaire de l'hôte; rendant moins intéressant l'utilisation de ces cellules d'origine testiculaire. Cependant, aucune étude n'a encore évaluée les effets positifs de la sécrétion d'IGF-II par les cellules de Sertoli sur une potentielle amélioration de la survie d'îlots de Langerhans encapsulés.

Par la suite, les macrophages ont été étudiés en raison de leur présence et de leur activation lors de l'utilisation de la microcapsule. Dans cet état actif, ils sont capables de produire de l'oxyde nitrique (NO) qui peut endommager l'îlot même s'il est encapsulé. L'utilisation d'inhibiteurs de l'oxyde nitrique synthase s'est avérée utile pour empêcher ces effets [216]. De plus, ce même groupe réussit à inhiber l'action du NO par la co-encapsulation d'îlots avec des érythrocytes autologues [216]; en raison de leur concentration élevée en hémoglobine et leurs capacités à éliminer le NO [217]. L'incorporation d'érythrocytes dans la membrane capsulaire permet également une meilleure diffusion de l'oxygène résultant en une meilleure survie de l'îlot encapsulé [218, 219].

La sousmuqueuse du petit intestin, un substrat du collagène est connue pour être riche en macromolécules de la matrice extracellulaire. En fait, elle peut également promouvoir la réparation des tissus, leur remodelage et la croissance des cellules [220, 221]. De plus, plusieurs groupes démontrèrent qu'une coculture avec cette muqueuse permettait d'améliorer la sécrétion d'insuline d'îlots fraîchement isolés mais également leur viabilité chez le chien [222, 223] et le rat [224-226]. Tian *et al.* conclurent que ces effets étaient dus à un apport subséquent de facteurs de croissance et à la reformation de la matrice extracellulaire des îlots par la sousmuqueuse. Cependant, ces études ont été faites chez l'îlot non-encapsulé rendant intéressant son évaluation avec des îlots encapsulés.

A.4.2.3 Cellules canaliculaires pancréatiques

Il est connu que les cellules canaliculaires sont étroitement reliées aux îlots depuis les premiers stades de la morphogénèse pancréatique [227]. Elles représentent 10% du pancréas en nombre et 4% en volume. Il est également possible de les identifier par la présence de marqueurs cellulaires nommés cytokératines (CK), selon l'espèce. En fait, il est connu que les cellules canaliculaires de souris expriment la CK 7, tandis que celles de rat et d'humain comportent les combinaisons de CK 19 et 20 ainsi que CK 7 et 19, respectivement [228]. Les cytokératines font parties de la famille des filaments protéiniques intermédiaires du cytosquelette de cellules épithéliales et mesurent environ de 8 à 12 nm [228]. De plus, ces cellules ont différentes fonctions tant digestives, sécrétoires que de différenciation.

A.4.2.3.1 Fonction digestive

Lors de la digestion, le bol alimentaire est en partie métabolisé dans l'estomac par la production d'acides gastriques. Par la suite, celui-ci doit être neutralisé dès son arrivée dans l'intestin. En fait, les cellules S du duodénum proximal, en réponse à la détection de l'acidité du chyme gastrique, produiront l'hormone sécrétine qui agira directement sur les cellules canaliculaires pancréatiques. Ces cellules, directement juxtaposées aux îlots, sécrèteront des bicarbonates (HCO_3^-) et de l'eau qui serviront à neutraliser le chyme gastrique [229, 230].

A.4.2.3.2 Fonctions sécrétoires

En 1993, le groupe de Rosenberg démontra *in vitro*, par un test à la thymidine radioactive, que les cellules canaliculaires pouvaient améliorer la prolifération cellulaire des îlots. Une co-incubation d'îlots avec un milieu

conditionné à ces cellules (duct-conditioned medium, DCM) confirma cette même conclusion [231]. Ils suggérèrent également qu'il y avait présence d'interaction trophique entre ces cellules et les îlots et que celle-ci était médiée par un facteur relâché par les cellules canaliculaires de façon paracrine. Par ailleurs, ce même groupe prouva, en 1999, que ces cellules, ou leur DCM, réduisaient le pourcentage d'îlots présentant un centre de nécrose [232] et augmentaient le nombre de cellules productrices d'insuline [232]. Par la suite, l'analyse du contenu protéique du DCM révéla une concentration d'IGF-II de 34 ng/ml mais aucune quantité d'IGF-I. Une incubation *in vitro* d'îlots avec cette même concentration d'IGF-II (34 ng/ml) permit de diminuer le nombre de cellules mortes et confirma le rôle de ce facteur dans les résultats obtenus. Finalement, ce groupe conclut que la perte du support trophique chez les îlots isolés était responsable en partie de leur mort cellulaire et que les cellules canaliculaires amélioraient la survie des îlots par une sécrétion paracrine d'IGF-II [232].

L'IGF-II est une protéine de 67 acides aminés et de 7.5 kDa. Ce facteur de croissance est sécrété principalement par le foie mais est présent dans la plupart des tissus. De plus, il se lie préférentiellement à la protéine de liaison IGF-BP3 (*insulin-like growth-binding protein 3*) et agit grâce à deux récepteurs différents : celui de l'insuline et le récepteur IGF de type 1. Ces effets sont tant métaboliques (stimulation et transport du glucose, synthèse de protéines) que de croissance (stimulation de la synthèse d'ARN et ADN, prolifération, différenciation et survie cellulaire) [233]. Il a également été démontré que l'IGF-II promouvait l'exocytose d'insuline par les cellules β pancréatiques chez un modèle de souris *ob/ob* [234].

Vers la fin des années 90, les études de Hill confirmèrent plus concrètement les effets de l'IGF-II sur le développement du pancréas. En fait, ils démontrèrent, chez le rat, qu'une diminution d'expression de ce facteur de croissance dans les 2 à 3 premières semaines de vie était en partie responsable de l'apoptose normale localisée chez les îlots [235]. Plus tard, ce même groupe démontra le rôle de

cytoprotection de l'IGF-II chez des îlots isolés de souris NOD exposés à certaines cytokines comme l'IL-1 β TNF- α et IFN- γ [27]. Finalement, Hill et son équipe utilisèrent un modèle transgénique de souris exprimant un taux élevé circulant d'IGF-II afin de supprimer l'apoptose caractéristique de la suppression développementale des cellules β chez des souris néonatales et obtinrent un pancréas hyperplasique [236, 237].

Notre laboratoire investiga par la suite les effets de l'IGF-II sur des îlots de rat encapsulés. Ces études permirent de démontrer *in vitro* que l'IGF-II améliorait la viabilité des îlots et diminuait l'incidence de mort apoptotique. Le nombre d'îlots nécessaires à l'induction de normoglycémie chez des souris diabétiques fut également diminué par une incubation avec de l'IGF-II avant la transplantation [238]. Les cellules TM4 génétiquement modifiées pour produire de l'IGF-II fut également utilisée dans notre laboratoire afin d'améliorer la survie des îlots isolés encapsulés (Données non publiées).

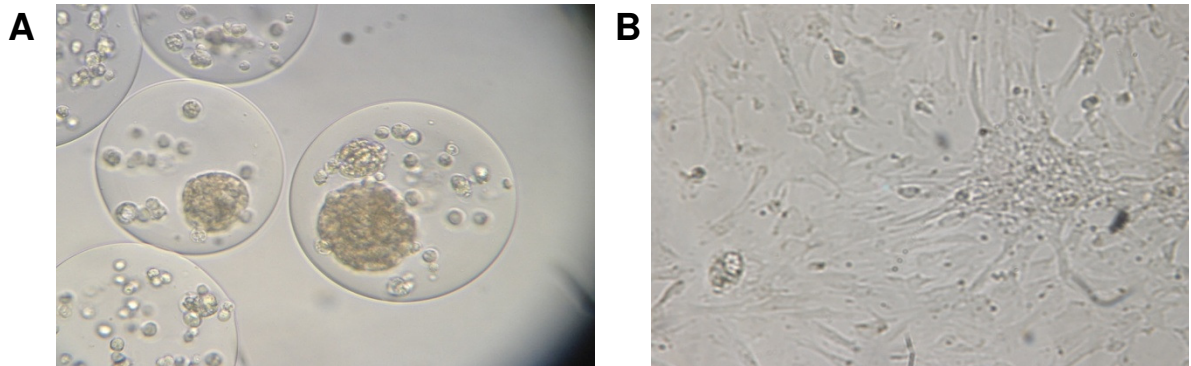
Plus récemment, le groupe de Pipeleers démontra que les cellules canaliculaires sécrétaient de l'interleukine-8 (IL-8) et du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) capable de promouvoir la revascularisation des îlots [239]. Ce facteur de croissance permet également d'améliorer la sécrétion d'insuline des îlots et peut diminuer significativement l'adhésion cellulaire d'une capsule d'AN69 [240]. De plus, il est connu qu'elles produisent en petite quantité (4 ng/ml) un autre facteur de croissance : le *nerve growth factor* (NGF) [232]; tout comme les cellules β [241]. Ce dernier permet la modulation de la plasticité des cellules β et améliore leur sécrétion d'insuline [242-244]. Miao *et al.* ont démontré que ce facteur permettait d'améliorer la survie d'îlots isolés *in vitro* et *in vivo* et ce avec une concentration de 500 ng/ml. De plus, l'injection intraveineuse de NGF (6 μ g) lors de la transplantation permet d'améliorer le temps d'euglycémie contrairement à des îlots non-traités mais semble moins efficace qu'une incubation de 24 heures avec ce facteur avant la transplantation [245, 246]. Ainsi, l'utilisation d'un

sécrétagogue du NGF pourrait être intéressante à complexer avec la capsule d'alginate ou à utiliser comme prétraitement avant et après l'encapsulation.

A.4.2.3.3 Transdifférenciation en cellules endocrines

Certains posent également l'hypothèse que l'isolation des îlots diminue les précurseurs des cellules β ; empêchant leur régénération. Ainsi, plusieurs études investiguèrent le rôle des cellules canaliculaires comme source potentielle de cellules β . Le groupe de Bonner-Weir prouva que ces cellules pouvaient se différencier en cellules productrices d'insuline [247, 248]; tandis que Ramiya *et al.* générèrent des îlots *in vitro* à partir de cellules canaliculaires stimulées pour produire des cellules α , β et δ [249]. Ce même groupe réussit même à renverser le diabète de type 1 *in vivo* à l'aide de ces îlots [249]. Le groupe de Rosenberg utilisa un modèle de nésidioblastose, défini comme étant la différenciation de l'épithélium canaliculaire en cellules endothéliales prolifératives [250], chez le hamster pour démontrer cette transformation [251]. Plusieurs groupes, quant à eux, se concentrèrent principalement sur les différents paramètres nécessaires [252, 253]; tandis que d'autres évaluèrent la capacité des cellules canaliculaires à améliorer la survie d'îlots isolés [232, 254]. Il semblerait même que cette transdifférenciation, favorisée par une culture sur un gel de collagène, soit possible à l'inverse : soit que des structures semblables aux cellules canaliculaires prennent leur origine dans les îlots de Langerhans [255-257]. Il a été également démontré que la composition cellulaire endocrine et nonendocrine d'une préparation prête à être transplanté pouvait influencer à long-terme la fonction métabolique du transplant [105, 258, 259]; et le contrôle de la glycémie [260, 261].

Figure 8 : **A.** *Îlots de Langerhans co-encapsulés avec des cellules canaliculaires pancréatiques.* **B.** *Cellules canaliculaires en culture.*



L'étude **D.2** investigate la possibilité d'utiliser les cellules canaliculaires pour recréer un environnement adapté pour les îlots encapsulés et ainsi améliorer leur survie *in vitro* et *in vivo*. Ceci permettrait entre-autre de diminuer le nombre d'îlots requis pour normaliser la glycémie mais également d'augmenter le temps de normoglycémie.

B. Raisonnement

B.1 Hypothèse 1

Il est déjà connu que l'alginate non-purifié contient bon nombre de contaminants (i.e. polyphénols, protéines et endotoxines) et que c'est en partie grâce à eux qu'une réaction immunitaire de l'hôte survient et met échec à l'implantation. Cependant, aucune étude n'avait été faite pour investiguer les effets directs de ces contaminants sur la survie et fonction de l'îlot encapsulé. Les résultats anticipés sont que la survie et fonction de l'îlot seront meilleures lorsqu'il sera encapsulé avec de l'alginate purifié contrairement à celui impur. Ceci expliquerait qu'il y a échec de l'implantation en raison d'une réaction immunitaire de l'hôte mais également par une diminution de la survie/fonction de l'îlot encapsulé. Il devient ainsi important que les méthodes de purification de l'alginate soient investiguées selon leurs effets sur l'îlot encapsulé également.

B.2 Hypothèse 2

La survie limitée de l'îlot encapsulé est un réel problème quant à l'échec de son implantation. Cependant, plusieurs solutions ont été proposées afin d'améliorer cette situation (i.e. purification de l'alginate, pompes à oxygène intégrées à la capsule, etc) mais une seule permettrait de recréer l'environnement initial de l'îlot avant son isolation. Les cellules canaliculaires se retrouvent à proximité de l'îlot dans le pancréas et permettraient, par des contacts cellule-cellule ou par la sécrétion d'un facteur trophique, d'augmenter la survie de l'îlot encapsulé.

C. Objectifs

C.1 Objectif 1

Déterminer, par des études *in vitro*, les impacts directs d'un alginate purifié et non-purifié sur la viabilité, la mort cellulaire (i.e. apoptose et nécrose) et la fonction (i.e. sécrétion d'insuline) d'îlots de Langerhans encapsulés.

C.2 Objectif 2

Déterminer les effets, *in vitro* et *in vivo*, d'une co-encapsulation de cellules canaliculaires pancréatiques avec des îlots de Langerhans sur la viabilité et la mort cellulaire (i.e. apoptose et nécrose) de ceux-ci ainsi que de leur capacité à normaliser la glycémie de souris immunodéficientes (SCID) diabétiques induites à la streptozotocine.

D. Études

D.1 Étude 1. Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilised in alginate-based microcapsules

Geneviève Langlois, Julie Dusseault, Stéphanie Bilodeau, Susan K. Tam, Dalla Magassouba et Jean-Pierre Hallé

Acta Biomaterialia. 2009 Nov;5(9):3343-3340. Epub 2009 Jun 9.

Rôle des coauteurs:

Julie Dusseault, Stéphanie Bilodeau, Susan K. Tam et Dalla Magassouba ont participé à la collecte de données et à la révision du manuscrit. Jean-Pierre Hallé a contribué à la conception du projet, ainsi qu'à l'écriture (30%) et la révision de l'article. Cependant, je suis celle qui a contribué de façon majeure à l'élaboration du projet, à la collecte de données, à leur analyse, à l'écriture de l'article et à sa révision.

À noter que le modèle de la bibliographie suit les spécifications de la revue Acta Biomaterialia.

Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilised in alginate-based microcapsules

Geneviève Langlois¹, Julie Dusseault¹, Stéphanie Bilodeau¹, Susan K Tam^{1,2},
Dalla Magassouba^{1,3}, Jean-Pierre Hallé¹

No benefit of any kind will be received either directly or indirectly by the authors.

¹ Research laboratory on bio-artificial therapies,

Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal, Montréal,
Québec, H1T 2M4, Canada

² Biomedical Engineering Institute, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3A7,
Canada

³ Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec,
G9A 5H7, Canada

* Corresponding author : Dr. Jean-Pierre Hallé

Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont

Pavillon Marcel-Lamoureux

5415 boul. de l'Assomption

Montréal, Qc, Canada, H1T 2M4

Fax : 514-252-3430

Abstract

Alginate purification has been shown to decrease the host immune response to implanted alginate-based microcapsules, but the direct effect of contaminants on islet cell survival remains unknown. Wistar rat islets were immobilised in calcium alginate beads made with crude versus purified alginate and then incubated in CMRL culture medium. At 1, 4, 7, 14 and 27 days post-encapsulation, islet survival was evaluated. Islet viability was investigated using a dual staining assay (propidium iodide and orange acridine). The islet cell necrosis and the proportion of apoptotic cells were quantified under optical microscopy and with a TUNEL assay, respectively. Islets immobilised in purified alginate were more viable, had fewer necrotic centers, a smaller area of central necrosis and a lower number of apoptotic cells. At day 14 and 27 post-encapsulation, respectively, 48% and 23% of islets were viable with purified alginate versus 18% and 8% with crude alginate ($p < 0.05$). At day 14, the surface area of central necrosis and the number of necrotic islets were more important with the impure alginate (65% vs 45% and 73% vs 53%, respectively; $p < 0.05$). Conclusion: alginate purification improves the survival of islets that are immobilised in alginate-based microcapsules. These findings indicate that caution should be exerted in the interpretation of *in vivo* experiments, wherein the results could be explained by either a direct effect on islet survival or a modification of the host reaction or both. Moreover, it suggests that the effect on islet viability should be assessed during the development of biomaterials for cell encapsulation.

Key words: Microencapsulation, islets of Langerhans, alginate purification, cell viability

Introduction

The transplantation of islets of Langerhans (islets) has improved the blood glucose levels and induced insulin independence in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes [1-2]. However, this treatment has several limitations, including inadequate reserve of insulin-secreting β -cells [2] and an absence of treatment to prolong islet cell survival, which result in a high percentage of recurrence of insulin-dependency ($\approx 90\%$ at 5 years) [3]. In addition, due to the requirement for life-long immunosuppression, this treatment is usually restricted to relatively advanced cases that have very labile diabetes, whereas improvement of blood glucose control early in the course of the disease would be more likely to prevent long-term complications of diabetes [4].

Microencapsulation of islets in semipermeable membranes has been experimented as a means to avoid immunosuppression by introducing a barrier between the transplanted cells and the host immune system [5-8]. Moreover, Korbitt *et al* have shown that immobilising islets in alginate beads improves islet cell survival *in vitro* and *in vivo* [9]. In the latter case, the improvement was not due to immunoprotection, since the experiments were conducted in either immunoincompetent animals (NUDE mice) or a model of syngeneic transplantation. It has been hypothesised that these results are explained by the tridimensional structure of the beads and/or by the development of a favourable microenvironment within the microcapsule. Korbitt *et al*. [9] have proposed the immobilization of islets in alginate beads as a means to promote islet cell survival during storage. Recently, Qi *et al* have shown that human islets that were isolated in Chicago (U.S.A.), sent to Trondheim (Norway), immobilised in alginate beads there and sent back to Chicago maintained a similar *in vitro* and *in vivo* (when transplanted into immunoincompetent diabetic mice) viability and function, compared to non-encapsulated islets that remained in the same location (Chicago) [10].

The most widely used system for islet immuno-isolation is the alginate-poly-L-lysine-alginate (APA) microcapsule. In this system, islets are immobilised in negatively charged alginate beads, by extrusion of islet-containing droplets into a divalent cation (eg. calcium or barium) bath, then successively incubated in a positively charged poly-L-lysine (PLL) solution that reinforces the microcapsule strength and allows the control of the membrane molecular weight cut-off, and finally in diluted alginate as an attempt to neutralise the PLL and decrease the microcapsule immunogenicity. Since PLL is known to be immunogenic, a variation of this system is to use non-PLL coated barium alginate beads.

Although the use of other polymers [11-13] has been experimented, none of them has been as extensively studied or has reached the same level of bioperformance as alginate for immobilizing islets. The principal reason is that alginate can be jellified in physiological conditions (room temperature, physiological pH and osmolarity), without producing toxic by-products. Moreover, the rapidity of the gelling process is an important advantage, since it allows the falling alginate droplet to retain the spherical shape that it has acquired in the air. One of the main barriers to the clinical application of this therapeutic approach is the host immune reaction against microcapsules, which leads to pericapsular cell overgrowth. The immune cells around microcapsule release cytokines which can cross the membrane and damage encapsulated cells. It may also limit the diffusion of nutrients, oxygen, waste products of metabolism, glucose and insulin.

Much effort has been devoted to decrease the immunogenicity of microcapsules. As a natural polymer that is extracted from seaweeds, alginate tends to be largely contaminated. In addition, the industrial extraction processes may introduce other contaminants. Methods have been developed for alginate purification [14-17]. The availability of purified alginate has considerably improved the bioperformance of microencapsulated islets, in terms of normalizing the blood glucose levels of diabetic animals. Most of these studies have focused on the

effect of alginate contaminants and alginate purification on the host response to microcapsules. For example, de Vos *et al* [14] have shown that the purification of alginate can reduce the number of overgrown microcapsules 1 year post-implantation in diabetic rats.

Due to its gelling properties described above, alginate is a particularly suitable biomaterial to immobilise islets and form the microcapsule core. In contrast, there is no reason why alginate would be irreplaceable as the polymer that is used for the outer coating of the microcapsules. (e.g. PMCG [18], PEG [19]) Thus, the most important role of alginate is to form the core of the microcapsule, which is in direct contact with immobilised cells in both systems, i.e. in complete APA microcapsules as well as in non coated barium alginate beads. In this perspective, it is surprising that few data have been published on the direct effect of alginate contaminants on encapsulated cell survival. The objective of the present work was to compare the effect on islet cell survival of immobilising islets in beads made with crude versus purified alginate.

Materials and Methods

Material and reagents

All reagents and solutions were prepared under endotoxin-free conditions using sterile non-pyrogenic disposable materials and sterile non-pyrogenic glassware. Pharmaceutical-grade sodium alginate Protanal® LF 10/60 (65-75% guluronic acid, M_w 135 kDa) was purchased from FMC Biopolymers (Drammen, Norway) and all other reagents (chloroform, acetone, alcohol, acetic acid, sodium citrate) were of analytical grade, purchased from Fisher Scientific Ltd. (Pittsburgh, PA, USA), and were used without further purification. Endotoxins on non-disposable materials were removed by washing for 60 minutes in Extran soap, then in distilled water, HCl 2N and sterile water followed by gas treatment. All manipulations were performed under sterile conditions whenever possible.

Alginate purification

For the purpose of this study, the Protanal® LF 10/60 alginate was purified using a protocol elaborated originally by Klöck et al. [15] with slight modifications. Briefly, 9 g of alginate powder was incubated in 400 ml of chloroform for 30 min and filtered under vacuum on Whatman no.4 filter paper. This chloroform extraction was performed three times. Then, alginate was dissolved in distilled water to a 1.5 % solution. Next, an equivalent alginate-weight of acid-washed activated charcoal was added to the solution and the mixture was stirred for 4 h. This procedure was repeated once using neutral charcoal. The solution was filtered on 0.22 μ m filters. Then, alginate beads were produced using a 50 mM $BaCl_2$ solution as the jellifying agent. Beads were washed with sterile water and then incubated three times in 1 M acetic acid (pH 2.3) for 14 h. Beads were washed with sterile water between each medium change. Next, beads were incubated twice in a 500 mM sodium citrate solution (pH 8) for 8 h. Beads were washed with sterile water at each medium

change. Then alginate beads were extracted twice with 50 % and 70 % ethanol (containing 5 % acetone) for 16 h each without sterile water wash. Thereafter, beads were retrieved from the solution and washed with a 20 mM BaCl₂ solution, then extensively with sterile water. Beads were dissolved into an alkaline 250 mM EDTA solution (pH 10) overnight. The recovered solution was filtered 0.22 µm and dialyzed (membrane MWCO 50,000 Da) against 150 mM NaCl for 20 h and distilled water for the same time with three medium changes each. Following the addition of 10 mM NaCl, alginate was precipitated with two volumes of 100 % ethanol and freeze-dried overnight [20].

Islet isolation

Islets, isolated from pancreases of Wistar rats (250-400g) (Charles River Institute, St-Constant, Qc, Canada) were isolated and purified as previously described [21]. Briefly, type V collagenase (Sigma-Aldrich Ltd. Oakville, ON, Canada), diluted (1 mg/ml) in Hank's balanced salt solution (HBSS), was infused into the pancreases via the common bile duct, followed by a 30 min incubation at 37°C. Afterward, islets were purified on 800 and 250 µm consecutive filters and on a discontinuous Euroficoll gradient (Mediatech Inc., Herndon, USA). To eliminate contaminating cells, islets (60-200 µm in diameter) were handpicked (> 95% purity) under an inverted light microscope and cultured overnight in RPMI 1640 medium (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON Canada) supplemented with 10% v/v new calf serum (NCS), 1% penicillin-streptomycin, 23.8 mM sodium bicarbonate and 15 mM HEPES at 37°C, 5% CO₂. Approximately 400 islet-equivalents (IEs) were isolated from each rat. All animal manipulations were done under the approval of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Animal Ethics Committee.

Islet microencapsulation

Islets were suspended in a 1.5% w/v purified alginate solution or a 2.3% w/v non-purified alginate solution for encapsulation. Afterward, using an electrostatic pulse generator [22], alginate droplets were extruded into a solution of 100 mM calcium lactate. Islets that were immobilized within calcium alginate beads (1 to 2 islets per capsule) were then cultured in CMRL 1066 (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 10% v/v of foetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin, 2.5% v/v of 1M HEPES and 0.01% w/v of Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) (Invitrogen Life Technologies). Evaluations of islet cell survival were performed at 1, 4, 7, 14 and 27 days post-encapsulation.

Evaluation of microencapsulated islet survival

Evaluation of islet viability using fluorescent dyes

Microencapsulated islet cell survival was evaluated *in vitro* using dual staining. [23-24] Briefly, aliquots of approximately 100 beads containing one or more islets per bead were stained with propidium iodide (PI; 1 mg/ml) and orange acridine (AO; 0.01 mg/ml) (Sigma-Aldrich Ltd) for 10 minutes at room temperature and protected from light. Using fluorescence microscopy, green (AO) and red (PI) staining indicated viable and dead cells, respectively. For analysis, each islet was classified into one of the following 5 categories: (green) when all the cells are viable, (green-green-red) when less than 10% of the cells are dead, (green-red) when 50% of the cells are viable, (red-red-green) when 10% of the cells are viable and (red) when all the cells are dead[25]. The percentage of viable islets was figured by dividing the number of islets in the first two categories by the total number of islets in the aliquot. This method, which was used in our previous paper [26], is based on the fact that the islets presenting more than 50% of dead cells have been shown to eventually die, while those presenting less than 50% dead

cells may eventually recover. Although this method provides a more accurate assessment of the overall islet viability than single staining methods (eg trypan blue), it may underestimate the status of the cells that are located in the center of the three-dimensional islets, which are likely to be more affected by hypoxia.

Evaluation of apoptosis in microencapsulated islets

The Tdt-mediated dUTP nick end labelling technique, named TUNEL assay, (Roche diagnostics, Laval, Quebec, Canada) was used to identify apoptotic cells [26] [27]. To eliminate non-specific reactions of the primary antibody, cells were treated with a Universal Protein Blocker (DAKO Diagnostics Inc, Mississauga, ON Canada) and previously with the Peroxidase Blocking Reagent (DAKO Diagnostics Inc) to neutralize endogenous peroxidase. A solution of Proteinase K (Invitrogen Life Technologies) was used to retrieve antigens that were eventually cross-linked with formalin. Afterward, islets were counterstained with the Dako Mayer's Hematoxylin (DAKO Diagnostics Inc) and mounted at 70°C for 30 minutes with the aqueous permanent mounting medium Ultramount (DAKO Diagnostics Inc.). To determine whether β -cells were apoptotic, the TUNEL assay and the identification of insulin using an immunoperoxidase test (DAKO Diagnostics Inc) were performed on consecutive slides. The same protocol was used for the identification of insulin with a polyclonal guinea pig anti-insulin antibody (DAKO Diagnostics Inc). For positive controls, we used islets with DNA breaks: islets were incubated for 20 minutes at 37°C in a solution of DNase-1 (10 U/ μ l) (Roche diagnostics, Laval, Quebec, Canada) with 4 mM $MgCl_2$, 0.1 mM DTT (Roche diagnostics) and 0.1% TaqBuffer 10X (Pharmacia Biotech, NJ, USA) or irradiated with 25 grays with a γ -cells irradiator (Gammacell 3000 Elan, MDS Nordion). These islets were cultured 48 hours in RPMI 1640 before their irradiation and then fixed in formalin.

Assessment of encapsulated islet morphology

Number of necrotic islets and surface area of central necrosis

Observations were made under an optical microscope [27] using a calibrated scale mounted in the eye-piece of the microscope. Aliquots of approximately 100 islets per experimental condition were used. The percentage of the necrotic area was obtained by dividing the total diameter of the central area of necrosis (μm) by the diameter of the whole islet (μm), and multiplying by 100. During the same observations, the number of necrotic and healthy islets was counted and the percentage of necrotic islets was figured.

Glucose-stimulated insulin secretion test

A static evaluation of insulin secretion was performed at day 14 post-encapsulation. Briefly, islets were isolated, encapsulated in one of the two types of alginate and then cultured in CMRL 1066 medium for 14 days with a change of the culture medium every second day. Islets were incubated in a series of different glucose concentrations (see below) diluted in RPMI 1640 using a 12 wells polystyrene plate (2 mL of supernatant per well) with a mesh of 74 μm and 15 mm of diameter and a sterile clamp to transfer the mesh (Corning Inc., NY, USA). Three samples of 150 IEs for each type of alginate were incubated 30 minutes with 3.3mM glucose, 2 hours in 3.3 mM glucose, 2 hours in 16.5mM glucose, 2 hours with 16.5 mM glucose + 10 mM theophylline and finally 2 hours in 3.3 mM of glucose. The supernatants were retrieved at the end of each incubation period and stored at -20°C . This experiment was done with three different samples from one islet isolation. Insulin levels were measured on the supernatants using a radioimmunoassay with a rat insulin antibody made in guinea pig and a goat anti-guinea pig immunoglobulin antibody as the primary and secondary antibody, respectively (RIA # RI-13K) (LINCO research, St. Charles, Missouri, USA).

Histology

After the encapsulation, at pre-determined culture period, islets were fixed in a formalin 10% buffer (ACP Chemicals Inc., Montreal, Quebec, Canada), entrapped in 2% low-melting agarose (Invitrogen Life Technologies, Inc.), and embedded in paraffin. Serial sections of 4 μm thickness were cut from each sample.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. The differences between the two types of alginate were analyzed by unpaired Student's *t-test* with *p* values less than 0.05 considered as significant.

Results

Evaluation of islet viability using fluorescent dyes

Using the double staining (AO/PI) viability test, the percentage of viable islets was higher with the use of purified alginate than with crude alginate, the difference being significant at days 1 and 14 (figure 1).

Evaluation of apoptosis in microencapsulated islets

Using the In Situ Cell Death detection kit, significantly more apoptotic cells were seen in islets that were encapsulated in crude than in purified alginate, particularly at days 7 and 14 post-encapsulation (figure 2). Moreover, the anti-insulin antibody showed a majority of positive cells, thus confirming that our samples were composed of pancreatic islets (data not shown).

Number of necrotic islets and surface area of central necrosis

Observation under an inverted microscope showed that, from day 1 to day 14 post-encapsulation, a significantly higher percentage of islets presented central necrosis when they were immobilized in crude alginate, compared to those immobilized in purified alginate. Also, the percentage of necrotic cells increased more quickly with the crude alginate (figure 3A). The percentage of the surface area of central necrosis over the complete islet area was also significantly higher in the islets that were immobilized in crude alginate, compared to those immobilized in purified alginate at days 7 and 14 (figure 3B).

Glucose-stimulated insulin secretion test

At 14 days post-encapsulation, the basal (5.19 ± 0.91 ng/ml) and stimulated (11.10 ± 0.80 ng/ml with 16.5mM glucose; 13.34 ± 0.18 ng/ml with 16.5 mM glucose + theophylline) insulin levels for islets encapsulated in purified alginate were not statistically different than the insulin levels for islets encapsulated in crude

alginate (7.55 ± 1.13 ng/ml for basal; 11.26 ± 0.83 ng/ml with 16.5mM glucose; 12.92 ± 0.14 ng/ml with 16.5 mM glucose + theophylline). The stimulation index (difference between the stimulated with 16.5 mM glucose and basal insulin levels) obtained with islets encapsulated in purified alginate (SI 5.91 ± 0.60) was significantly higher ($p < 0.01$) than that obtained with islets encapsulated in crude alginate (SI 3.71 ± 0.32), indicating healthier islets. A significant difference of SI ($p < 0.01$) was obtained between the two types of alginate for the stimulation by 16.5 mM glucose + theophylline (figure 4).

Discussion

The results of these experiments, using different methods for the assessment of islet cell viability, concur that alginate purification has a positive effect on islet cell survival. The dual staining (AO + PI) fluorescence method was selected because it is more appropriate for the study of tridimensional multicellular structures such as islets than vital staining with trypan blue only. With the former method, both dead cells, which are coloured in red by PI and living cells, which are coloured in green by AO, can be visualized. The results showed that islets that were encapsulated using purified alginate present improved survival compared to those encapsulated using non purified alginate. Moreover, the study of islet cell necrosis and the TUNEL assay both showed more dead cells when the crude alginate was used as compared to the results that were obtained with the purified alginate, suggesting that both necrosis and apoptosis are involved in the process. The glucose-stimulated insulin secretion tests showed a significantly higher stimulation index for islets that were encapsulated in purified alginate than for those encapsulated using crude alginate, indicating that contaminants may also impair insulin secretion.

Previous *in vivo* studies have found that alginate purification improves the post-transplantation survival of islets that are encapsulated in alginate-based microcapsules. Initial studies, using empty (i.e. containing no cells) microcapsules, have shown that alginate purification considerably decreases the immune and fibrosis reactions that develop around the capsules after implantation. Therefore, it has generally been assumed that the impaired cell survival is caused by the high immunogenicity of unpurified alginates, thus by the host reaction against microcapsules. De Vos *et al.* [14] have obtained euglycaemia in diabetic rats within 5 days post-implantation using their pure alginate capsule. However, hyperglycaemia reoccurred within 6 to 20 weeks. They suggested that the limited duration of euglycaemia might be caused by the poor blood supply. Zhang *et al.*

[28] compared two commercial alginate preparations, non purified Keltone LV (Kelco International, London U.K.) and commercially available purified UPLVG (Pronova Biopolymer, Oslo, Norway). They found that islets that were encapsulated in purified alginate had a significantly higher viability than islets encapsulated in crude alginate, after their recovery four weeks post-transplantation in mice. *In vitro* viability tests, performed immediately after encapsulation, failed to show any significant difference between the two types of alginates. Recently, Mallett and Korbitt have shown that the use of another commercially purified alginate (Pronova UP MVG) allows the normalisation of blood glucose levels in rodents for over 105 days; their modified version (i.e. more extensive purification) of this alginate has further improved the transplantation success. [29]. It is noteworthy that the difference between the blood glucose values that they obtained with the two types of alginate was significant only after 2 weeks post-transplantation. This finding is in agreement with our observation that the difference in the viability is significant after 14 days. This might explain why Zhang *et al.* found no significant differences immediately post-encapsulation. Differences between the types of alginate that were used in the two laboratories could be another explanation for the discrepancy of the results. Pericapsular overgrowth has been reported in many other *in vivo* studies using crude alginate [16] [28] [30].

More research is required to identify which contaminant(s) is (are) specifically responsible for the decrease in islet cell viability and to determine which mechanism(s) is (are) involved. There are several mechanisms that may potentially explain the effect of alginate contaminants on cell viability. Contaminants may have a direct toxic effect on islet cells, for example by triggering pro-apoptotic signalling pathways or inhibiting anti-apoptotic pathways or by activating the intracellular production of free radicals. It has been demonstrated that endotoxin contamination (LPS) within collagenase or Ficoll, both used for islet isolation, has a deleterious effect on islet survival and on insulin secretion [31-34]. A direct link between endotoxin content and the intra-islet production of IL-1 β , IL-6 and TNF- α was found

[31]. LPS and released cytokines may activate the inducible nitric oxide synthase (iNOS), thus increasing the amount of intra-islet NO leading to dysfunctional insulin secretion [35-36]. It has been proposed that endotoxins may act indirectly by stimulating resident macrophages. More specifically, LPS has been shown to bind to CD14 receptors on macrophages or directly on islet α and β cells [37]. This was seen in cardiomyocytes as well [38]. More recently, an implication of toll-like receptors (TLR) 1 and TLR4 as well as their associated molecule myeloid-differentiation-2 was also suggested [37]. Finally, we previously found [39] that contaminants may increase the immunogenicity of microcapsules by modifying physicochemical properties of alginate, such as hydrophilicity and viscosity. Similar mechanisms are potentially involved in their effect on islet cell survival.

The alginate chemical composition, particularly the mannuronic acid/guluronic acid ratio, has also been shown to influence the immunogenicity of APA microcapsules [30] [40]. The present study did not address the effect of the alginate chemical composition on islet cell survival. Nevertheless, the fact that the nature of alginate was shown to have an effect suggests that it is warranted to evaluate such a possibility in future studies.

The limited duration of insulin independence in recipients of islet transplantation has stimulated efforts to develop methods to promote long-term islet cell survival. The mere immobilization of islets in alginate beads improves islet cell survival, without any other specific interventions [9]. The microcapsule offers a scaffold and support that can be used to develop methods to further ameliorate survival. Several approaches have been experimented to achieve this objective, such as the incorporation of oxygen transporters or oxygen generators in the microcapsule matrix [41] or the co-encapsulation of islets and cells that release beneficial molecules (unpublished data). However, before the experimentation of such potentially beneficial interventions, the first logical step is to identify and remove the detrimental factors. The results of the present work suggest that this

step may be important. From an experimental point of view, it also shows that when alginate modifications improve the *in vivo* bioperformance of the transplant, caution should be exerted before attributing this effect to improved biocompatibility with the host only, since a direct effect on islet cell survival is another potential explanation.

In conclusion, the present study demonstrates that alginate contaminants may directly impair islet cell survival, in addition to their known effect on microcapsule immunogenicity.

Acknowledgments

Support was provided by the Canadian Diabetes Association (CDA) and Diabète Québec (ADQ).

References

1. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343(4):230-8.
2. Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 2001;50(4):710-9.
3. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005;54(7):2060-9.
4. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005;353(25):2643-53.
5. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980;210(4472):908-10.
6. de Vos P, Andersson A, Tam SK, Fass M, Hallé J. Advances and barriers in mammalian cell encapsulation for treatment of diabetes. *Immun Endoc and Metab Agents in Med Chem* 2006;6:139-153.
7. Orive G, Tam SK, Pedraz JL, Halle JP. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials* 2006;27(20):3691-700.
8. Halle JP, de Vos P, Rosenberg L, editors. *The bioartificial pancreas and other biohybrid therapies*. Kerala, India: Research Signpost; 2008.
9. Korbitt GS, Mallett AG, Ao Z, Flashner M, Rajotte RV. Improved survival of microencapsulated islets during in vitro culture and enhanced metabolic function following transplantation. *Diabetologia* 2004;47(10):1810-8.
10. Qi M, Lokensgard B, Morch, Y, Wang, YW, Barbaro B, Gangemi A, Kuechle J, Romagnoli T, Hansen MA, Rodriguez LA, Benedetti E, Huenkeler D, Skjak-Baek, G., Oberholzer, J. Encapsulation of Human islets in novel inhomogeneous alginate-Ca²⁺/Ba²⁺ microbeads: in vitro and in vivo function. *Artificial cells, blood substitutes and biotechnology* 2008; 36(5):403-420
11. Dusseault J, Hallé J. Alginate hydrogels for cell microencapsulation and immunoprotection. In: Hu J, editor. *Recent advances in biomaterials research*. Kerala, India: Research Signpost; 2008. p. 23-42.

12. Aomatsu Y, Iwata H, Takagi T, Amemiya H, Nakajima Y, Hanehiro H, et al. Microencapsulated islets in agarose gel as bioartificial pancreas for discordant xenotransplantation. *Transplantation Proceedings* 1992;24:2922-2923.
13. Laurent TC, Fraser JR. *Journal of Faseb* 1992;6(7):2397.
14. De Vos P, De Haan BJ, Wolters GH, Strubbe JH, Van Schilfgaarde R. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* 1997;40(3):262-70.
15. Prokop A, Wang TG. Purification of polymers used for fabrication of an immunoisolation barrier. *Ann N Y Acad Sci* 1997;831:223-31.
16. Klock G, Frank H, Houben R, Zekorn T, Horcher A, Siebers U, et al. Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994;40(5):638-43.
17. Wandrey C, Vidal DS. Purification of polymeric biomaterials. *Ann N Y Acad Sci* 2001;944:187-98.
18. Lacik I, Brissova M, Anilkumar AV, Powers AC, Wang T. New capsule with tailored properties for the encapsulation of living cells. *J Biomed Mater Res* 1998;39(1):52-60.
19. Chandy T, Mooradian DL, Rao GHR. Evaluation of modified alginate-chitosan-polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation. *Artificial Organs* 1999;23:894-903.
20. Ménard M, Dusseault J, Langlois G, Baille W, Tam S, Yahia L, et al. Role of protein contaminants in the immunogenicity of alginates. In press, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009
21. Gotoh M, Maki T, Kiyozumi T, Satomi S, Monaco AP. An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation* 1985;40:437-438.
22. Hallé JP, Leblond FA, Pariseau JF, Jutras P, Brabant MJ, Lepage Y. Studies on small (< 300 microns) microcapsules: II--Parameters governing the production of alginate beads by high voltage electrostatic pulses. *Cell Transplant* 1994;3(5):365-72.
23. Bank HL. Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. *Diabetologia* 1987;30(10):812-6.
24. Bank HL. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cell Dev Biol* 1988;24(4):266-73.

25. Miyamoto M, Morimoto Y, Nozawa Y, Balamurugan AN, Xu B, Inoue K. Establishment of fluorescein diacetate and ethidium bromide (FDAEB) assay for quality assessment of isolated islets, *Cell transplantation* 2000; 9(5):681-686
26. Robitaille R, Dusseault J, Henley N, Rosenberg L, Hallé J. IGF-II allows prolonged blood glucose normalization with a reduced islet cell mass transplantation. *Endocrinology* 2003;144(7):3037-3045.
27. Ilieva A, Yuan S, Wang RN, Agapitos D, Hill DJ, Rosenberg L. Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. *J Endocrinol* 1999;161(3):357-64.
28. Zhang WJ, Laue C, Hyder A, Schrezenmeir J. Purity of alginate affects the viability and fibrotic overgrowth of encapsulated porcine islet xenografts. *Transplant Proc* 2001;33(7-8):3517-9.
29. Mallett AG, Korbitt GS. Alginate Modification Improves Long-Term Survival and Function of Transplanted Encapsulated Islets. *Tissue Eng Part A* 2008.
30. Zimmermann U, Klock G, Federlin K, Hannig K, Kowalski M, Bretzel RG, et al. Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. *Electrophoresis* 1992;13(5):269-74.
31. Vargas F, Vives-Pi M, Somoza N, Armengol P, Alcalde L, Marti M, et al. Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 1998;65(5):722-7.
32. Brandhorst H, Brandhorst D, Brendel MD, Hering BJ, Bretzel RG. Assessment of intracellular insulin content during all steps of human islet isolation procedure. *Cell Transplant* 1998;7(5):489-95.
33. Jahr H, Pfeiffer G, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG. Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll. *J. Mol. Med.* 1999;77(1):118-120.
34. Vargas F, Vives-Pi M, Somoza N, Fernandez-Llamazares J, Pujol-Borrell R. Endotoxin activity of collagenase and human islet transplantation. *Lancet* 1997;350(9078):641.
35. Arnush M, Heitmeier MR, Scarim AL, Marino MH, Manning PT, Corbett JA. IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function. *J Clin Invest* 1998;102(3):516-26.

36. Corbett JA, McDaniel ML. Intra-islet release of interleukin-1 inhibits α cell function by inducing α cell expression of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine* 1995;181:559-569.
37. Vives-Pi M, Somoza N, Fernandez-Alvarez J, Vargas F, Caro P, Alba A, et al. Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin Exp Immunol* 2003;133(2):208-18.
38. Comstock KL, Krown KA, Page MT, Martin D, Ho P, Pedraza M, et al. LPS-induced TNF- α release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30(12):2761-75.
39. Tam SK, Dusseault J, Polizu S, Menard M, Halle JP, Yahia L. Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation. *Biomaterials* 2006;27(8):1296-305.
40. Klock G, Pfeffermann A, Ryser C, Grohn P, Kuttler B, Hahn HJ, et al. Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates. *Biomaterials* 1997;18:707-713.
41. Zekorn T, Siebers U, Bretzel RG, S H, U M, H R, et al. *Horm. Metab. Res.* 1991;23:302.

Figure Legends

Figure 1. *Evaluation of islet viability using fluorescent dyes.*

Black, islets encapsulated in crude alginate; *Grey*, islets encapsulated in purified alginate. The percentage of viable cells was obtained by dividing the number of viable islets by the total number of islets in the sample then multiplying by 100. An islet was considered viable when > 50% of cells stained in green (AO) and < 50% stained in red (PI). For each day, studies were performed on 8 to 13 different islet preparations. Data are presented as mean \pm SEM. Difference between the results obtained with purified versus crude alginate: ϵ , $p < 0.001$. *, $p < 0.05$.

Figure 2. *Evaluation of apoptosis in microencapsulated islets.*

Degree of apoptosis (red cells; some examples indicated by arrows) in islets that were immobilised in purified versus crude alginate at 1 (A and F), 4 (B and G), 7 (C and H), 14 (D and I) and 27 (E and J) days post-encapsulation, as evaluated with an immunohistochemistry assay using the In Situ Cell Death detection. All photos were taken at 63X magnification. (D1, D4, D7 and D27 n=2; D14: n=3)

Figure 3. *Number of necrotic islets and surface area of central necrosis.*

Black, islets encapsulated in crude alginate; *Grey*, islets encapsulated in purified alginate. **A.** Quantitative assessment of the percentage of necrotic islets. The number of islets with central necrosis was divided by the total number of islets in the sample. For each day post-encapsulation, 6 to 10 different islet preparations were studied. **B.** Quantitative assessment of the surface area of central necrosis. The diameter of the surface area of central necrosis was measured with a calibrated scale and divided by the diameter of the whole islet. For each day post-

encapsulation, 6 to 11 islet preparations were studied. Data are presented as mean \pm SEM. Difference between the results obtained with the purified versus the crude alginate: γ , $p < 0.01$. δ , $p < 0.005$. ϵ , $p < 0.001$. *, $p < 0.05$

Figure 4. *Glucose-stimulated insulin secretion test*

Black, islets encapsulated in crude alginate; *Grey*, islets encapsulated in purified alginate. Evaluation of the insulin secretion when stimulated with glucose (16.5 mM) or with glucose (16.5 mM) + theophylline (10mM). The stimulation index is defined by the increase in insulin secretion (Δ ng/ml) when stimulated by glucose (or glucose/theophylline) minus the basal secretion (3.3 mM); γ , $p < 0.01$

Figures

Figure 1

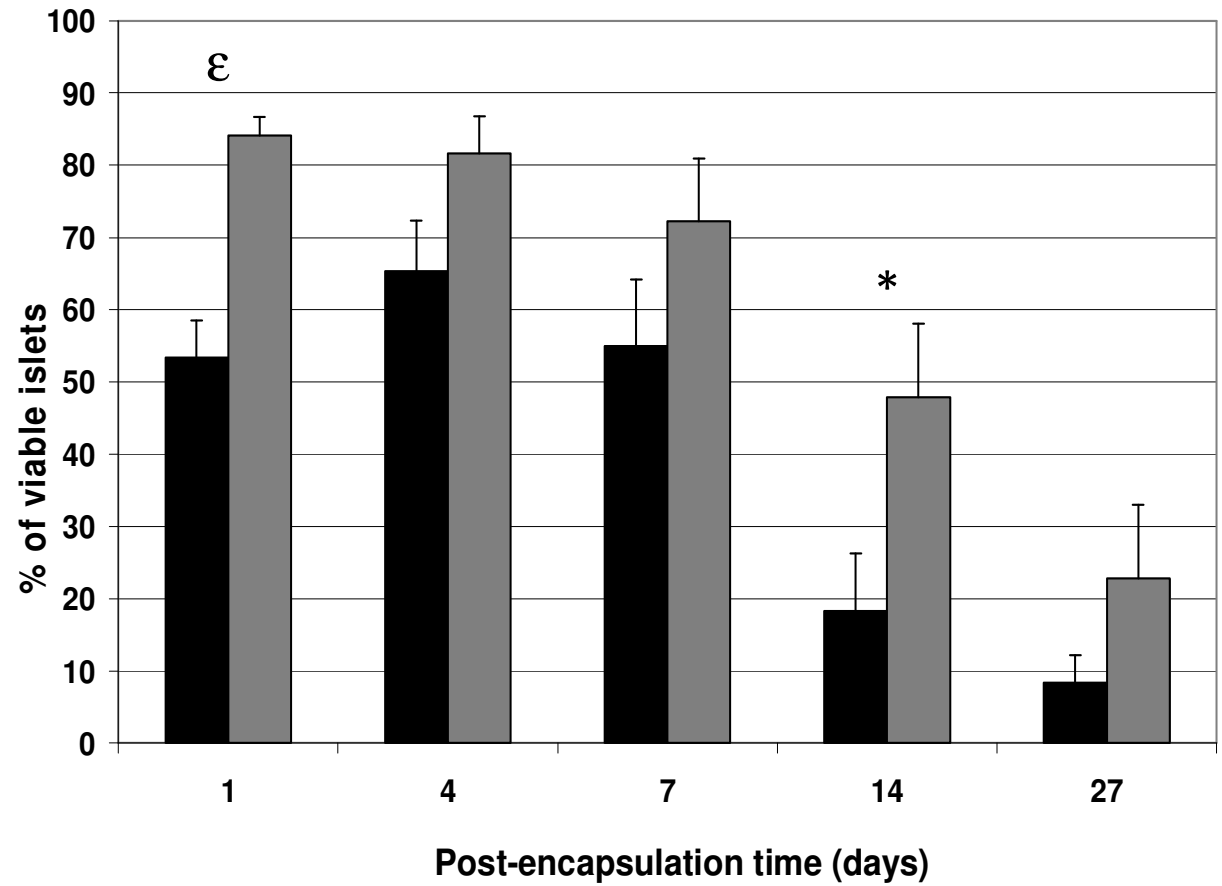


Figure 2

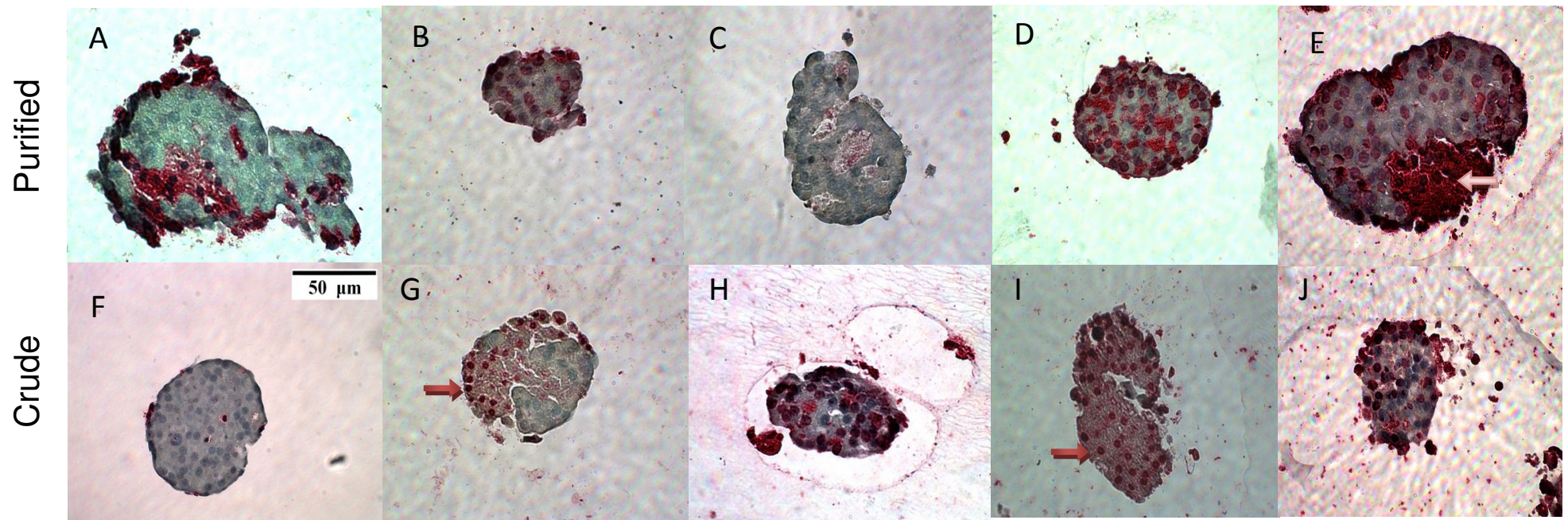


Figure 3

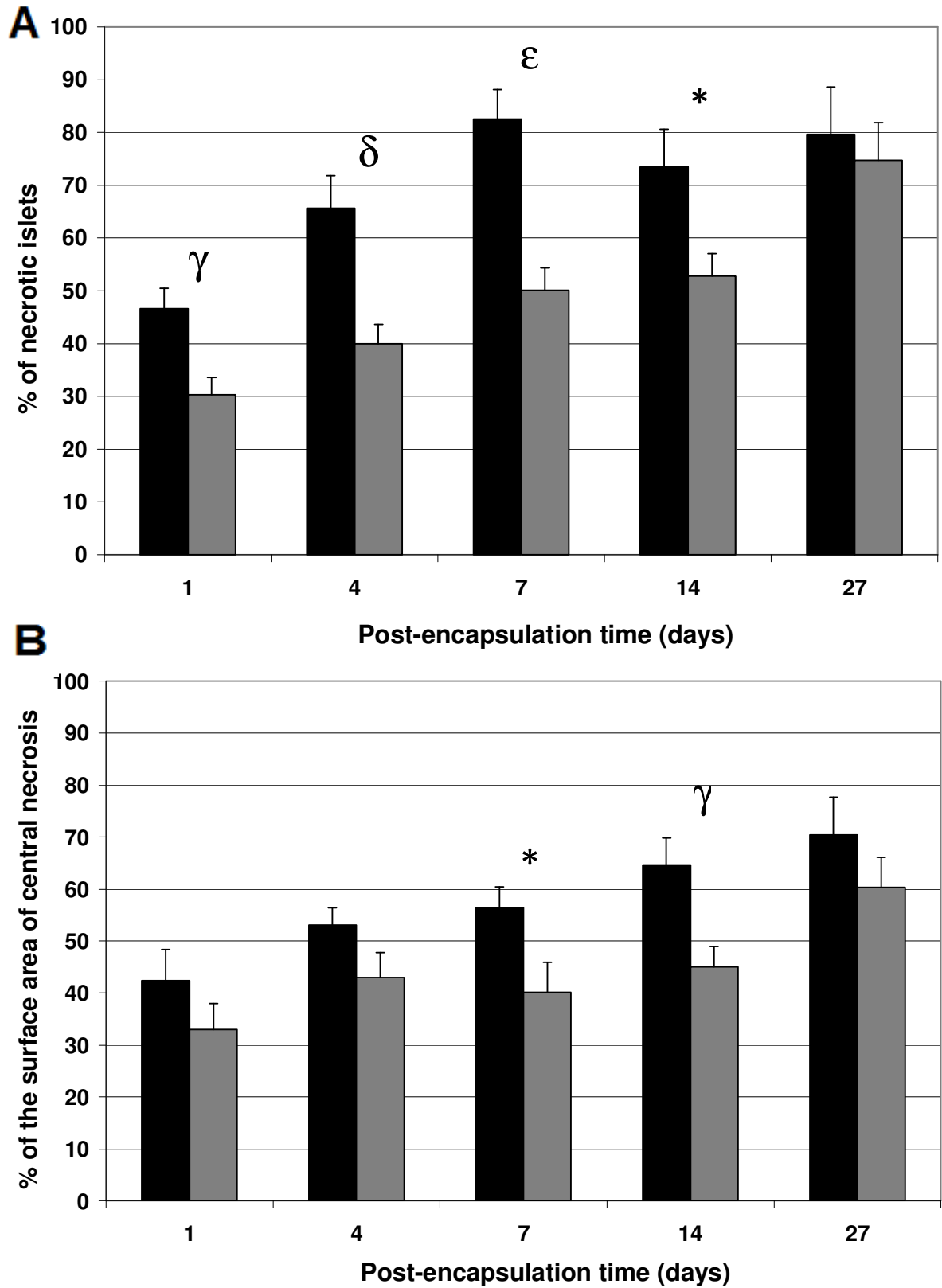
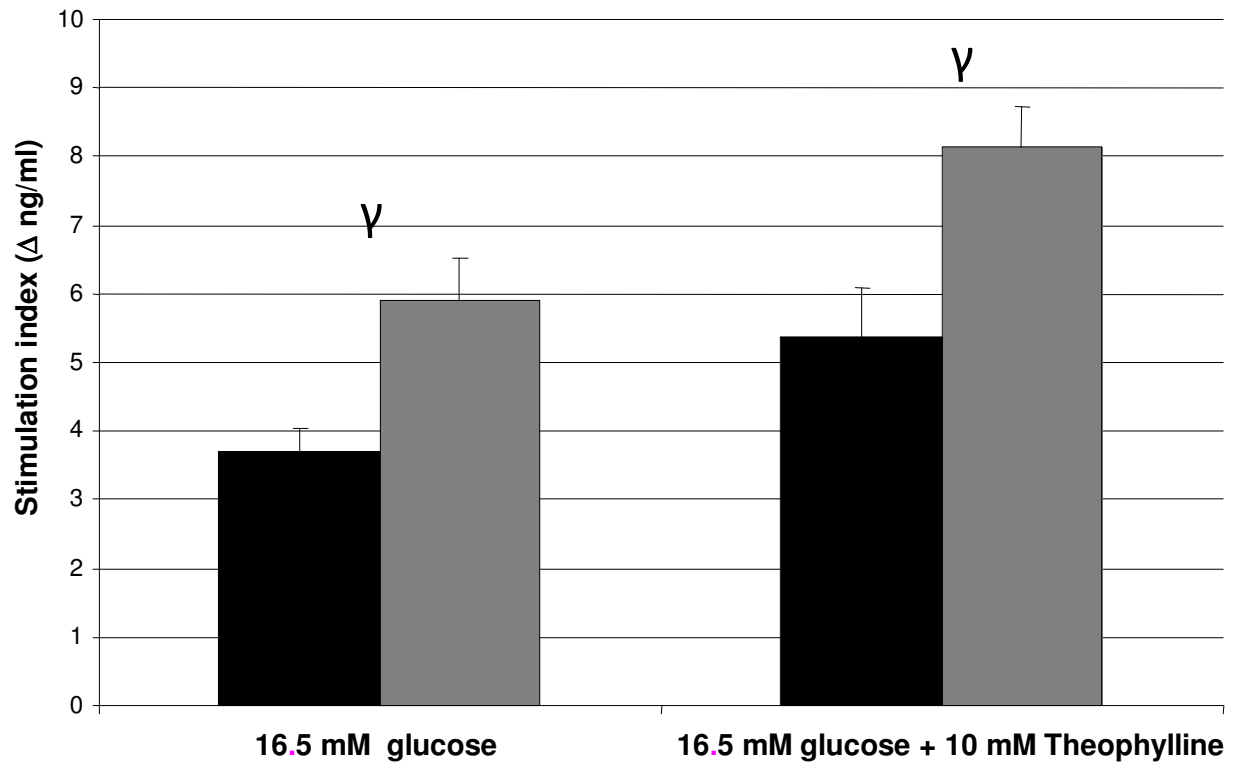


Figure 4

D.1.1 Résultats supplémentaires

Légende des figures supplémentaires

Figure 1. *Identification de cellules β par immunohistochimie contre l'insuline*

A. Identification de l'identité des cellules encapsulées qui seront colorées au TUNEL assay. À noter que la très grande majorité de l'îlot est colorée identifiant ainsi les cellules β présentes. (Idée générale des photos obtenues) Image obtenue à l'aide de l'objectif de 40X (n=3 pour chaque jour de l'expérimentation).

Figure 2. *Contrôles positifs utilisés lors de l'identification de la mort cellulaire par apoptose des îlots encapsulés (TUNEL assay).*

A. Contrôle positif pour l'identification de la mort cellulaire par apoptose d'un pancréas de rat traité à l'ADN 1 qui occasionne des bris d'ADN. Image obtenue grâce à un agrandissement de 40X. (n=4) À noter que la très grande majorité des cellules ont été colorées en rouge (i.e. couleur du substrat utilisé : Fast Red). **B.** Autre contrôle positif obtenu grâce à un îlot traité aux rayons gamma; traitement connu pour occasionner une mort cellulaire par apoptose spécifiquement. Photo prise avec une amplification de 40X. (n=4). N.B. Des contrôles négatifs ont été faits (i.e. îlot fraîchement isolé ou traité aux rayons gammas non-exposé à l'anticorps anti-dUTP).

Résultats complémentaires

Figure 1

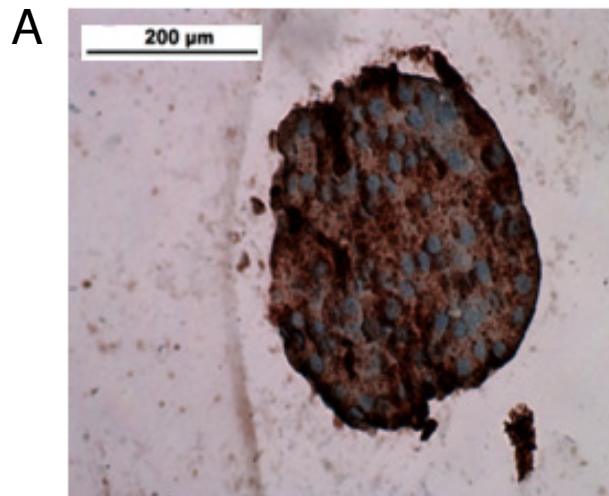
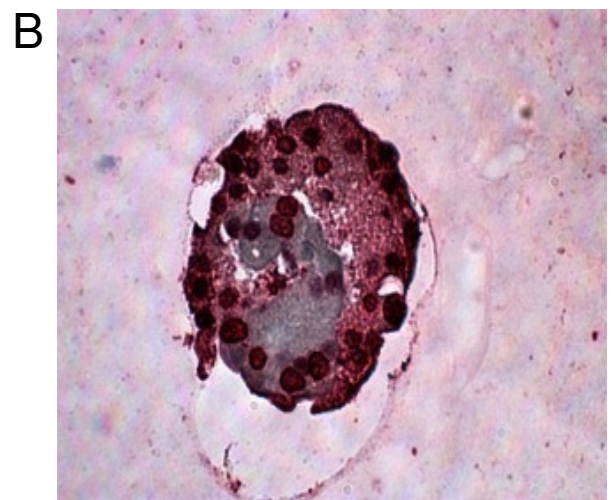
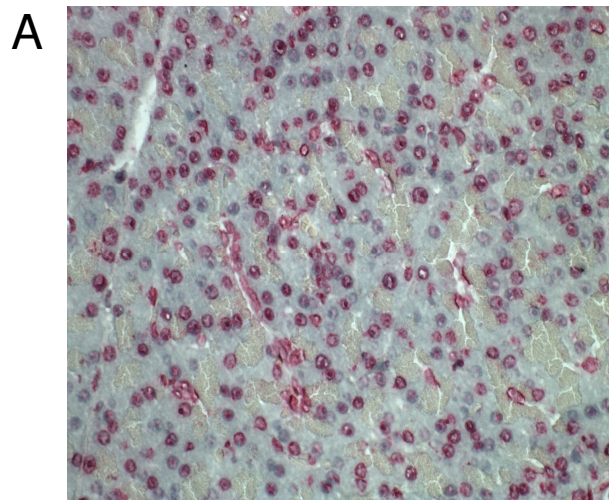


Figure 2



D.2 Étude 2. Effects of the co-encapsulation of duct cells with islets on the viability and function of islets

Geneviève Langlois, Julie Dusseault, Stéphanie Bilodeau, Susan K. Tam et Jean-Pierre Hallé

Cell transplantation 2009; Soumis et sous révision

Rôle des coauteurs:

Julie Dusseault, Stéphanie Bilodeau et Susan K. Tam ont participé à la collecte et analyse des données ainsi qu'à la révision du manuscrit. Jean-Pierre Hallé a contribué à la conception du projet ainsi qu'à l'écriture (20%) et la révision de l'article. Cependant, je suis la principale responsable de l'élaboration du projet, de la collecte de données, de leur analyse, de l'écriture de l'article et de sa révision.

À noter que la mise en forme de la bibliographie a été tirée des spécifications de la revue Cell Transplantation.

Effects of the co-encapsulation of duct cells with islets on the viability and function of islets

Geneviève Langlois¹, Julie Dusseault¹, Stéphanie Bilodeau¹, Susan K. Tam^{1,2}, Lawrence Rosenberg³, Jean-Pierre Hallé¹

¹Research laboratory on bio-artificial therapies, Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal, Montréal, Québec, H1T 2M4, Canada

²Biomedical Engineering Institute, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3A7, Canada

³SMBD-Jewish General Hospital, 3755 Côte-Sainte-Catherine Road, Mc Gill University, Montreal, Quebec, H3T 1E2, Canada

Running title : Co-encapsulating pancreatic duct cells and islets

* Corresponding author : Dr. Jean-Pierre Hallé
Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont
Pavillon Marcel-Lamoureux
5415 boul. de l'Assomption
Montréal, Qc, Canada, H1T 2M4
Tel : 514-252-3400 #3305 Fax : 514-252-3430

Abstract

Pancreatic duct cells have been shown to positively influence the viability and function of isolated islets and the outcome of islet transplantation. Therefore, we investigated the effect of co-encapsulating duct cells with islets on islet cell survival and function. Islets were encapsulated in alginate microcapsules, alone or co-encapsulated with one of two different concentrations of dispersed duct cells (20 or 100 per capsule) and cultured *in vitro*. Their viability (dual staining acridine orange/propidium orange assay), percentage of apoptotic cells (TUNEL assay) and central necrosis were studied at 1, 7, 14 and 27 days post-encapsulation. *In vivo* studies compared the efficiency of islets co-encapsulated with duct cells vs. islets encapsulated alone, in normalizing the blood glucose in mice with streptozotocin-induced diabetes. No significant differences were detected between islets co-encapsulated with duct cells and islets encapsulated alone in terms of their viability, apoptosis, and neither percentage of necrotic cells nor area of central necrosis. Islets encapsulated with 100 duct cells per capsule did not normalize blood glucose more efficiently than those implanted with islets encapsulated alone. We conclude that the co-encapsulation of dispersed duct cells and islets does not improve the *in vitro* and *in vivo* survival of islet cells.

Keywords: duct cell, encapsulation, islets of Langerhans, IDDM

Introduction

The transplantation of the islet of Langerhans (islets) is a promising treatment for patients with type 1 diabetes mellitus. However, this treatment has several limitations such as the requirement for lifelong use of immunosuppressive drugs and the limited duration of insulin independence (41). In order to avoid the use of immunosuppressors, islets have been entrapped within semipermeable microcapsules so as to introduce a physical barrier between the transplanted islets and the host immune system, while allowing the free diffusion of small molecules such as glucose, insulin, oxygen and nutrients (9,28,33). Nonetheless, the normalisation of blood glucose that follows microencapsulated islet transplantation is limited to one to 12 months in large mammals (25,26,42,44). Therefore, strategies to enhance islet viability and function must continue to be investigated.

Initial strategies for improving the outcome of islet transplantation focused on the purification of the islets because it was assumed that this procedure reduces graft immunogenicity and enhances engraftment (40). Nevertheless, in spite of the fact that whole pancreas transplantation requires major surgery and contains more immunogenic tissue, it has provided better outcomes than isolated islet transplantation (46). This suggests that the islet isolation procedure and/or the separation of islets from the exocrine pancreas play a role in the limited duration of islet graft function. Indeed, the islet isolation process disrupts islet links with the vasculature and innervations. Moreover, isolated islets are withdrawn from the environment provided by the pancreas. It was shown by the group of Pipeleers's *et al.* (23,24) that the composition of the transplant, regarding β and non- β endocrine cells, may improve the long-term outcome of islet transplantation vs a transplant composed of β -cells only. The loss of the trophic support and microenvironment normally found in the exocrine pancreas was proposed by Rosenberg's group as a possible explanation for graft failure (22).

Pancreatic duct cells have been shown to play an important role in pancreas morphogenesis and origin (13,39). They represent 10% of the pancreas cells and 4% of the organ volume (4), and they can be identified by the expression of a marker of epithelial cell differentiation, cytokeratin (CK) (4,6). They secrete growth factors such as nerve growth factor (NGF) (22) and IGF-II (22), the latter being known to influence cell growth, survival and differentiation in the foetal and adult pancreas (18,19,22,35,37,47). A number of studies suggest that duct cells, which are normally found in the microenvironment, can influence islet function and viability. Rosenberg *et al.* have shown that co-incubation of hamster islets with duct fragments, duct-conditioned medium (DCM) or with insulin-like growth factor II (IGF-II; which was the most abundant peptide in the DCM) stimulates islet cell replication and decreases islet cell apoptosis and necrosis that occur in the immediate (48 h) post isolation period. Korbitt *et al.* have observed a significant positive correlation between the number of cytokeratin-positive cells (duct cells) in the islet preparations and the acute insulin response to glucose (AIRg) from one month to one year post transplantation. They suggested that the improvement in human islet graft survival has a direct relation with the presence of a progenitor cell population in the duct cell fraction of the transplant (43). In agreement with this hypothesis, several studies have confirmed that pancreatic duct cells are an important source of islet progenitors and therefore have proposed that they may be implicated in the long-term outcome of the transplant (3,5,10,17).

Following Rosenberg's suggestion that IGF-II secreted by duct cells may explain their positive effect on islet survival, we have evaluated the effect of IGF-II in a transplantation setting (38). We found that a 48 h incubation of rat islets in IGF-II decreases islet cell apoptosis and necrosis in a dose-dependent manner, *in vitro*. The transplantation of these microencapsulated islets into diabetic mice induced prolonged normalisation of blood glucose in twice as many mice using a reduced number of islets ($\approx 50\%$) when islets were pre-incubated in IGF-II vs.

without IGF-II incubation. To test the hypothesis that continuous *in vivo* supply of IGF-II to islets can prolong islet survival, we co-encapsulated bio-engineered IGF-II producing cells with islets and showed enhanced *in vitro* as well as *in vivo* survival and function (unpublished data; to editors and reviewers: this paper is currently under review). That said, the clinical application of unmodified cells may be more easily accepted by regulatory agencies than that of bio-engineered cells. Therefore, we undertook the present study to test the hypothesis that co-encapsulating islets and duct cells can improve islet cell survival and function.

Materials and Methods

Materials and reagents

All solutions and reagents were prepared under endotoxin-free conditions using sterile non-pyrogenic glassware and sterile non-pyrogenic disposable materials. Pharmaceutical-grade sodium alginate Keltone LVCR® (37% guluronic acid as confirmed by nuclear magnetic resonance) was purchased from ISP Corp. (New Jersey, USA) and all other reagents (chloroform, acetone, alcohol, acetic acid, sodium citrate) were of analytical grade, purchased from Fisher Scientific Ltd. (Pittsburgh, PA, USA), and were used without further purification. Endotoxins on non-disposable materials were removed by washing in Extran soap, then in distilled water, HCl 2N and sterile water followed by EO gas treatment. Manipulations were performed under sterile conditions whenever possible.

Alginate purification

For the purpose of this study, the Keltone LVCR® alginate was purified using a protocol elaborated originally by Klöck et al. (25) with slight modifications (27). Briefly, alginate powder was extracted by chemical steps. Then, alginate beads were produced using BaCl_2 , washed with sterile water and then incubated in acetic acid, sodium citrate solution and 50 % and 70 % ethanol. Beads were dissolved into an EDTA solution overnight. The recovered solution was filtered 0.22 μm and dialyzed against NaCl and distilled water. Following the addition of NaCl, alginate was precipitated with 100 % ethanol and freeze-dried overnight.

Islet isolation

Islets were isolated from pancreases of Wistar rats (250-400g) (Charles River Institute, St-Constant, Qc, Canada) and then purified as previously described (15,27). Briefly, type V collagenase (Sigma-Aldrich Ltd. Oakville, ON, Canada), was infused into the pancreases via the common bile duct, followed by an incubation at 37°C. Afterwards, the islets were purified on consecutive filters and on a discontinuous Euroficoll gradient (Mediatech Inc., Herndon, USA). To eliminate contaminating cells, islets (60-200 µm in diameter) were handpicked under an inverted light microscope to achieve > 95% purity and then cultured overnight in RPMI 1640 medium (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 10% v/v new calf serum (NCS) (Invitrogen Life Technologies), 1% pen-strep, 23.8 mM sodium bicarbonate, 15 mM HEPES and 500 ng/ml recombinant human insulin-like growth factor II (IGF-II) (ID Labs biotechnology inc., London, ON, CA) at 37°C, 5% CO₂. Approximately 400 islet-equivalents (IEQs) were isolated from each rat. All animal manipulations were done under the approval of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Animal Ethics Committee.

Duct cell isolation and culture

Mouse duct cells were isolated following a published protocol (45). Briefly, pancreases from male C57BL/6J mice (15-20g) aged 27-35 days (Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA, USA) were removed and cut into small pieces in HBSS supplemented with 50% v/v F-12 Nutrient Mixture (HAM) 1X solution (Invitrogen Life Technologies) and 1% pen-strep. After a 30-45 min digestion at 37°C (0.1% w/v type 5 collagenase, 0.1% w/v Hyaluronidase (Sigma-Aldrich Ltd)), 0.1% w/v soybean trypsin inhibitor (SBTI) (Invitrogen Life Technologies) in a F-12 solution), the pellet was cultured for 2 hours at 37°C (5% CO₂). The culture supernatant was removed and cultured in a 6 well plate at 37°C (5% CO₂) with a

concentration of 1×10^6 cells per well. After each confluence, the cells were pooled and put in culture at a concentration of 1×10^4 cells per well. After each passage, plastic tissue culture coverslips (22mm, Sarstedt Inc, Newton, NC, USA) were placed in each well of one to two plates for further characterization. To fix the duct cells, the coverslips were incubated for five minutes in phosphate-buffered solution (PBS), 10 minutes in methanol and then dried at room temperature. This method results in the production of dispersed duct cells that can be easily and considerably expanded in culture.

Islet microencapsulation alone or with duct cells

Islets were suspended in a solution of purified Keltone® alginate (1.63% w/v in saline), either alone or with one of two different concentrations of duct cells (8×10^5 or 4×10^6 duct cells per mL) for encapsulation. Using an electrostatic pulse generator (16), alginate droplets were extruded into a solution of 10 mM barium chloride to induce gelation of the alginate solution. On average, the resulting capsules containing one islet and, in the case of co-encapsulated, 20 or 100 duct cells per capsule. Immobilized islets (1 islet per capsule) were then cultured in IMEMZO (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 10% v/v of horse serum (Invitrogen Life Technologies), 1% pen-strep, 2.5% v/v of 1M HEPES and 0.01% w/v SBTI. Evaluations of islet cell survival and function were performed at 1, 7, 14 and 27 days post-encapsulation. For the *in vivo* studies, islets encapsulated alone or with duct cells (100 duct cell per capsule) were cultured overnight in the Ultraculture medium (Lonza Walkersville Inc., Walkersville, MD, USA) supplemented with 500 ng/ml IGF-II and 1% v/v pen-strep, before being implanted.

Duct cell characterization

Duct cell identification

CK7 and insulin immunochemistry; IGF-II immunofluorescence

For the CK7 identification, adherent duct cells were treated with a Peroxidase Blocking Reagent to eliminate non-specific reactions of the primary antibody, followed by a Universal Protein Blocker and with an unconjugated AffiniPure Fab fragment anti-mouse IgG. Duct cells were identified using a CK7 antibody (Abcam, Cambridge, MA, USA) and the LSAB-2 kit, counterstained with the Dako Mayer's Haematoxylin and mounted at 70°C for 30 minutes with the aqueous permanent mounting medium Ultramount. For the IGF-II staining, a rabbit anti-mouse IGF-II antibody (Novozymes GroPep limited, Thebarton, SA, Australia) was used over-night (O/N) at room temperature. The cells were then treated with a normal goat serum blocking solution (Invitrogen Life Technologies) followed by an incubation (30 min, room temperature, protected from light) with a goat anti-rabbit antibody linked to the fluorochrome Alexa Fluor 488 (Invitrogen Life Technologies). Their nucleus was identified by a fluorescent mounting medium with DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). To determine whether β -cells were contaminating the duct cell culture, insulin was identified using an immunoperoxidase test slightly modified with a polyclonal guinea pig anti-mouse for the insulin antibody minus the AffiniPure Fab fragments. Other unspecified materials used for duct cell identification were purchased from DAKO Diagnostics Inc (Mississauga, ON Canada).

Evaluation of encapsulated duct cell survival and function

Aliquots of 100 capsules, containing 100 duct cells each, were washed twice in HBSS supplemented with 10% NCS and pooled in a 96 wells plate in a final volume of 100 μ l. Twenty μ l of the reagent CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corp, Madison, WI, USA) were added and the plate was incubated 3 hours at 37°C. The absorbance of the formazan produced is detected by a spectrophotometer at 492 nm with a reference filter at 620 nm (7). [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS]

In vitro studies

Evaluation of microencapsulated islet survival

Evaluation of encapsulated islet viability using fluorescent dyes

Microencapsulated islet cell survival was evaluated *in vitro* using dual staining (1,2,27,38). Briefly, aliquots of \approx 100 encapsulated islets were stained with propidium iodide (PI; 1 mg/ml) and orange acridine (AO; 0.01 mg/ml) for 10 minutes at room temperature and then protected from light. Using fluorescence microscopy, green (AO) and red (PI) staining indicated viable and dead cells, respectively. For semi-quantitative measurement of viability, each islet was classified into one of the following 5 categories: (green) when all the cells are viable, (green-green-red) when less than 10% of the cells are dead, (green-red) when 50% of the cells are viable, (red-red-green) when 10% of the cells are viable and (red) when all the cells are dead (32). The percentage of viable islets was figured by dividing the number of islets in the first two categories by the total number of islets in the aliquot. Experiments were performed in the IMEMZO medium because we observed that duct cells cannot survive and proliferate in the

medium CMRL 1066, while islets can survive in IMEMZO medium (Data not shown).

Evaluation of apoptosis in microencapsulated islets

A Tdt-mediated dUTP nick end labelling technique, i.e. TUNEL assay (Roche diagnostics, Laval, Quebec, Canada), was used to identify apoptotic cells (15,22) on 4µm paraffin embedded slices. To eliminate non-specific reactions, cells were treated with a Universal Protein Blocker and previously with a Peroxidase Blocking Reagent. A solution of Proteinase K (20mg/ml, Invitrogen Life Technologies) was used to retrieve antigens that were eventually cross-linked with the formalin. Next, the islets were counterstained with Dako Mayer's Hematoxylin and mounted at 70°C for 30 minutes with Ultramount. To determine whether the β-cells were apoptotic, the TUNEL assay and the identification of insulin using an immunoperoxidase test (DAKO Diagnostics Inc) were performed on consecutive slides. The same protocol was used for the identification of insulin using a polyclonal guinea pig anti-insulin antibody (DAKO Diagnostics Inc). For positive controls, we used islets with DNA breaks: islets were incubated for 20 minutes at 37°C in a solution of DNase-1 (10 U/µl) with 4 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT and 0.1% TaqBuffer 10X (Pharmacia Biotech, NJ, USA) or irradiated with 25 grays using a γ-cells irradiator (Gammacell 3000 Elan, MDS Nordion). The latter islets were cultured 48 hours in RPMI 1640 before their irradiation and then fixed in formalin.

Evaluation of microencapsulated islet necrosis.

Observations were made under an optical microscope (22) using a calibrated scale mounted in the eye-piece of the microscope. Aliquots of approximately 100 encapsulated islets per experimental condition were used. The percentage of the necrotic area was obtained by dividing the total diameter of the central area of necrosis (μm) by the diameter of the whole islet (μm) and multiplying by 100. During the same observations, the number of necrotic and healthy islets was counted and the percentage of necrotic islets was figured.

In vivo studies

Recipients

Diabetes in male *scid* (Severe Combine ImmunoDeficiency) mice aged 3 to 6 months was induced by intra-peritoneal injection of streptozotocin (150 mg/kg body weight in sodium citrate buffer, pH 4.5; Sigma-Aldrich Ltd) after an overnight fasting. Insulin glargine (Lantus, Sanofi Aventis, Laval, QC, CAN) was injected every 24 h for 5 days at a concentration of 0.125 units (U) or 0.25U, diluted in saline solution (150 mM NaCl, 12.5 mM HEPES), when glycaemia was between 10-20 mM or 20-30 mM respectively. Diabetic mice (blood glucose > 20mM for a successive 5 days) were used as recipients for transplantation. Controls groups included diabetic mice transplanted with nonencapsulated islets or simply injected with ringer solution (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1.7 mM CaCl_2 , 1% v/v HEPES 1M). *Scid* mice were used to avoid any potential immune response of the host to microcapsules and therefore allow the study of the effects of duct cells without this interfering factor.

Transplantation

After isolation, islets were divided into three groups: nonencapsulated, encapsulated alone or co-encapsulated with duct cells (100 duct cells per capsule). After 24 hours incubation in the Ultraculture medium, islets were counted to obtain aliquots of 150 islet-equivalents (IEQs), suspended in ringer, and transplanted via a 16-gauge catheter into the peritoneal cavity of diabetic *scid* mice. A final injection of insulin (0.125U) was given at the time of transplantation.

Follow-up of diabetic animals

Mice had free access to water and food (C.R. rodent 18%; PMI nutrition, MO, USA) following the transplantations. Body weight and blood glucose, monitored from mouse-tail veins, were measured every day or every second day for the first week prior to transplantation and at least once a week after transplantation. Mice were considered to be normoglycemic when glucose levels were less than 11mM. Mice were euthanized after two measures of hyperglycaemia following reoccurrence of diabetes.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm the standard error of the mean (SEM). For the *in vivo* study, results are expressed as the percentage of normoglycemic mice. Differences were analyzed using the unpaired Student's *t-test* (*in vitro* studies) or using the two-sided *Fisher's exact test* (*in vivo* study) with *p* values of ≤ 0.05 considered as significant.

Results

Characterisation of duct cells by immunohistochemistry and immunofluorescence

Duct cells stained positive for CK7 and IGF-II but not for insulin (Data not shown). This indicates that the duct cell preparations were expressing two known markers of duct cells and were not contaminated with islet cells. This result was confirmed at 3 different passages (n=2).

Evaluation of encapsulated duct cell survival and function

The production of formazan at four different times (i.e. 1, 7, 14 and 27 days post-encapsulation) was evaluated for duct cells encapsulated at a concentration of 100 duct cells per capsule. The function obtained was similar in time and no significant difference was observed (data not shown).

In vitro studies

Effect of co-encapsulation with duct cells on islet cell viability

The percentage of viable islets for the three experimental groups (islets encapsulated alone or co-encapsulated with either 20 or 100 duct cells per microcapsule) was obtained using the dual staining (AO/PI) technique at 1, 7, 14 and 27 days post-encapsulation. No significant differences were observed between the groups at any time point (figure 1A).

Evaluation of apoptosis in microencapsulated islets

Apoptotic cells were investigated using the TUNEL assay at 1, 14 and 27 days post-encapsulation. Day 7 evaluations were omitted because preliminary results indicated a strong similarity to day 14 results. A significant difference was observed, at day 1, between the extent of apoptosis in islets encapsulated alone and those encapsulated with 100 duct cells per capsule; apoptosis was more important with islets encapsulated alone ($p < 0.001$) (figure 1B). This difference in apoptosis levels, however, was not apparent at later time points. Furthermore, co-encapsulation with 20 duct cells per capsule had no significant effect on the apoptosis levels at any time point. Anti-insulin immunochemistry confirmed that the samples were composed mainly of pancreatic islets (data not shown) ($n \geq 3$).

Percentage of necrotic islets and central necrosis surface areas

Observations under an inverted microscope showed that, from 1 to 27 days post-encapsulation, neither the percentage of necrotic islets nor the size of the necrotic centers differed significantly between the three experimental groups (figure 2A and B, respectively). The number of necrotic islets diameters was maintained between 30 and 50% throughout the study period.

In vivo studies

Islets (150 IEQs) were encapsulated alone or with duct cells (100 cells per capsule) and then transplanted into the peritoneal cavity of diabetic *scid* mice. The proportion of normoglycemic mice was similar throughout the study time course between the two experimental groups, with the exception of day 2 ($p < 0.01$) (figure

3). In both cases, normoglycemia started to lapse after two weeks and graft function totally failed before two months.

Discussion

The present study is the first to investigate the effects of co-encapsulating islets and dispersed pancreatic duct cells on islet survival and function. First, we cultured duct cells isolated from C57BL/6J mice and confirmed their identity and purity. Then, we co-encapsulated rat islets with two different concentrations of duct cells (20 or 100 cells per microcapsule) and evaluated the *in vitro* survival and *in vivo* function of the islets. The results showed no significant differences between the three groups of encapsulated islets in terms of their viability and degree of necrosis *in vitro*. Moreover, co-encapsulating islets and duct cells did not improve the effect of islet transplantation on the maintenance of normal blood glucose in diabetic mice (fig. 3).

Previous studies have found either positive (22,30,43) or negligible (21) effects of pancreatic duct cells on islet survival. Mechanisms that could either promote or hamper cell viability have been identified or proposed. Their relevance for explaining the results of the present study depends on the experimental conditions including the application to isolated islets versus whole pancreas, *in vitro* versus *in vivo* and free versus encapsulated islets.

The Rosenberg's group has shown, *in vitro*, that the incubation of isolated hamster islets with duct fragments (cyst-like structures) or duct-conditioned medium (DCM) enhances islet cellular replication (30) and decreases the incidence of necrosis and the apoptotic index of non-encapsulated islets (22). Several experimental parameters may explain the differences between their results and that of the present study. Firstly, we used dispersed single duct cells, as opposed to cyst-like duct structures. We selected to use this type of preparation because we were familiar with the technique and these duct cells can be easily and considerably expanded in culture, frozen, thawed and re-expanded. Therefore, large numbers of cells could be available at the selected times, an advantageous

feature for the proposed application. A preparation from a single donor could have provided duct cells for several recipients. On the other hand, cyst-like structures represent a more physiological conformation for duct cells to be in the pancreas. Moreover, cyst-like structures may contain a higher number of cells than the 100 cells per capsules that were used in the present study. Another experimental difference is that rat tail collagen gel has been used for their *in vitro* culture. Collagen gel is known to positively influence the reorganization of isolated islets, and reinforce their secretion activity (29) as well as to promote islet cell proliferation (31). Moreover, extracellular matrix molecules, such as collagen, make niches that can contain growth factors and control their access to cell receptors (8,20). It is noteworthy that Rosenberg's experiments have not shown any positive or negative influence of duct cells on the incidence of the islet necrotic center; in agreement with the findings of the present study (Figure 2B). However, our results showed that dispersed single duct cells do not have the expected positive effect encountered with duct cysts. More research is needed to determine whether co-encapsulating cyst-like duct cell structures would improve islet cell survival.

Other technical details might also explain the absence of effect of duct cells on encapsulated islets *in vitro*. For example, Gatto *et al.* found that, after 14 days, co-culture of human islets and duct cells enhanced the insulin stimulation index (ISI) at 33°C but not at 37°C (12). Since the experiments of the present study were conducted at the physiological temperature (37°C), this condition might explain some of the *in vitro* results.

Duct cells have adverse effects as well on islet survival. Pippeleers *et al.* (36) have suggested that duct cells may be potential participants in early insulinitis that leads to diabetes. Inflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6, IFN- γ and TNF- α , are produced by infiltrating lymphocytes during the development of immune insulinitis and immune reaction to transplanted islets. Different cells may produce these cytokines including resident lymphocytes within islets and microcapsules and

β -cells (11,14). Duct cells may add a significant contribution to the production of inflammatory cytokines as well. Ichii *et al.* have shown that duct cells produce IL-1, IL-6, IFN- γ and TNF- α (21). Moreover, Pavlovic *et al.* (34) have found that the combination of IL-1 and IFN- α increases by 12-fold the nitric oxide production by duct cells and stimulates the mRNA expression and protein production of inducible nitric oxide synthase (iNOS). They estimated that >50% of total islet nitric oxide production might originate from associated duct cells. NO concentrations must reach a certain level to be toxic for β -cells. The addition of NO by duct cells may allow this toxic level to be attained and thus induce β -cell death. These inflammatory cytokines may have an effect both *in vitro* and *in vivo* as well as for free and encapsulated islets. Therefore, they can possibly explain the absence of a positive effect of co-encapsulating islets and duct cells.

In conclusion, the results of the present study showed that, under the experimental conditions used, the co-encapsulation of islets with dispersed duct cells does not improve the *in vitro* and *in vivo* survival of islet cells. More research is needed to identify the mechanisms that explain this absence of effect and possibly define the conditions that would allow therapeutic applications of duct cells in the setting of microencapsulated islet transplantation.

Acknowledgments

Financial support was provided by the Canadian Diabetes Association (grant # GA-3-06-2108-JH). G.L. and S.B. received student scholarships from Diabète Québec. J.D. received a student scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). S.K.T. received student scholarships from the FRSQ and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

Disclosures

No benefit of any kind will be received either directly or indirectly by the authors.

References

1. Bank, H. L. Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. *Diabetologia* 30(10):812-816.; 1987.
2. Bank, H. L. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cell Dev Biol* 24(4):266-273.; 1988.
3. Bonner-Weir, S.; Taneja, M.; Weir, G.; Tatarkiewicz, K.; Song, K. H.; Sharma, A.; O'Neil, J. J. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* 97:7999-8004; 2000.
4. Bouwens, L. Cytokeratins and cell differentiation in the pancreas. *J Pathol* 184(3):234-239; 1998.
5. Bouwens, L.; Pipeleers, D. G. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. *Diabetologia* 41(6):629-633; 1998.
6. Bouwens, L.; Wang, R. N.; De Blay, E.; Pipeleers, D. G.; Kloppel, G. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes* 43(11):1279-1283; 1994.
7. Bunger, C. M.; Jahnke, A.; Stange, J.; de Vos, P.; Hopt, U. T. MTS colorimetric assay in combination with a live-dead assay for testing encapsulated L929 fibroblasts in alginate poly-L-lysine microcapsules in vitro. *Artif Organs* 26(2):111-116.; 2002.
8. Chen, Q.; Lin, T. H.; Der, C. J.; Juliano, R. L. Integrin-mediated activation of MEK and mitogen-activated protein kinase is independent of Ras [corrected]. *J Biol Chem* 271(30):18122-18127; 1996.
9. de Vos, P.; Andersson, A.; Tam, S. K.; Faas, M. M.; Halle, J. P. Advances and barriers in mammalian cell encapsulation for treatment of diabetes. *Immun Endoc and Metab Agents in Med Chem* 6(2):139-153; 2006.

10. Dudek, R. W.; Lawrence Jr, I. E.; Hill, R. S.; Johnson, R. C. Induction of islet cytodifferentiation by fetal mesenchyme in adult pancreatic ductal epithelium. *Diabetes* 40:1041-1048; 1991.
11. Foulis, A. K.; McGill, M.; Farquharson, M. A. Insulitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man--macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J Pathol* 165(2):97-103; 1991.
12. Gatto, C.; Callegari, M.; Folini, M.; Conconi, M.; Paolin, A.; Di Falco, G.; Bredariol, S.; Spinazzi, R.; Parnigotto, P. P.; Nussdorfer, G. G. Effects of cryopreservation and coculture with pancreatic ductal epithelial cells on insulin secretion from human pancreatic islets. *Int J Mol Med* 12(6):851-854.; 2003.
13. Githens, S. Differentiation and development of the pancreas in animals. In: Go, V. L.; Dimagno, E. P.; Gardner, J. D.; Lebenthal, E.; Reber, H. A.; Scheele, G. A., eds. *The pancreas: biology, pathobiology and disease*. New York: Raven Press; 1993:21-55.
14. Goldsby, R.; Kindt, T.; Osborne, B. *Immunologie: Le cours de Janis Kuby*, DUNOD ed. Paris: Sciences SUP; 2003.
15. Gotoh, M.; Maki, T.; Kiyozumi, T.; Satomi, S.; Monaco, A. P. An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation* 40:437-438; 1985.
16. Hallé, J. P.; Leblond, F. A.; Pariseau, J. F.; Jutras, P.; Brabant, M. J.; Lepage, Y. Studies on small (< 300 microns) microcapsules: II--Parameters governing the production of alginate beads by high voltage electrostatic pulses. *Cell Transplant* 3(5):365-372.; 1994.
17. Heremans, Y.; Van De Casteele, M.; in't Veld, P.; Gradwohl, G.; Serup, P.; Madsen, O.; Pipeleers, D.; Heimberg, H. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol* 159(2):303-312; 2002.

18. Hill, D. J.; Duvillie, B. Pancreatic development and adult diabetes. *Pediatr Res* 48(3):269-274.; 2000.
19. Hill, D. J.; Petrik, J.; Arany, E. Growth factors and the regulation of fetal growth. *Diabetes. Care.* 21 Suppl 2:B60-B69; 1998.
20. Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110(6):673-687; 2002.
21. Ichii, H.; Miki, A.; Yamamoto, T.; Molano, R. D.; Barker, S.; Mita, A.; Rodriguez-Diaz, R.; Klein, D.; Pastori, R.; Alejandro, R. and others. Characterization of pancreatic ductal cells in human islet preparations. *Lab Invest* 88(11):1167-1177; 2008.
22. Ilieva, A.; Yuan, S.; Wang, R. N.; Agapitos, D.; Hill, D. J.; Rosenberg, L. Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. *J Endocrinol* 161(3):357-364.; 1999.
23. Keymeulen, B.; Anselmo, J.; Pipeleers, D. Length of metabolic normalization after rat islet cell transplantation depends on endocrine cell composition of graft and on donor age. *Diabetologia* 40:1152-1158; 1997.
24. Keymeulen, B.; Korbitt, G.; De Paepe, M.; Gorus, F.; Kloppel, G.; Pipeleers, D. G. Long-term metabolic control by rat islet grafts depends on the composition of the implant. *Diabetes* 45(12):1814-1821; 1996.
25. Klock, G.; Frank, H.; Houben, R.; Zekorn, T.; Horcher, A.; Siebers, U.; Wohrle, M.; Federlin, K.; Zimmermann, U. Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. *Appl Microbiol Biotechnol* 40(5):638-643.; 1994.
26. Kulseng, B.; Thu, B.; Espevik, T.; Skjak-Braek, G. Alginate polylysine microcapsules as immune barrier: permeability of cytokines and immunoglobulins over the capsule membrane. *Cell Transplant* 6(4):387-394.; 1997.

27. Langlois, G.; Dusseault, J.; Bilodeau, S.; Tam, S. K.; Magassouba, D.; Halle, J. P. Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilized in alginate-based microcapsules. *Acta Biomater*; 2009.
28. Lim, F.; Sun, A. M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210(4472):908-910.; 1980.
29. Lucas-Clerc, C.; Massart, C.; Campion, J. P.; Laumois, B.; Nicol, M. Long-term culture of human pancreatic islets in an extracellular matrix : morphological and metabolic effects. *Molecular and Cellular Endocrinology* 94:9-20; 1993.
30. Metrakos, P.; Yuan, S.; Agapitos, D.; Rosenberg, L. Intercellular communication and maintenance of islet cell mass--implications for islet transplantation. *Surgery* 114(2):423-427; discussion 427-428.; 1993.
31. Metrakos, P.; Yuan, S.; Qi, S. J.; Duguid, W. P.; Rosenberg, L. Collagen gel matrix promotes islet cell proliferation. *Transplantation Proceedings* 26:3349-3350; 1994.
32. Miyamoto, M.; Morimoto, Y.; Nozawa, Y.; Balamurugan, A. N.; Xu, B.; Inoue, K. Establishment of fluorescein diacetate and ethidium bromide (FDAEB) assay for quality assessment of isolated islets. *Cell Transplant* 9(5):681-686; 2000.
33. Orive, G.; Tam, S. K.; Pedraz, J. L.; Halle, J. P. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials* 27(20):3691-3700; 2006.
34. Pavlovic, D.; Chen, M. C.; Bouwens, L.; Eizirik, D. L.; Pipeleers, D. Contribution of ductal cells to cytokine responses by human pancreatic islets. *Diabetes* 48(1):29-33; 1999.
35. Petrik, J.; Pell, J. M.; Arany, E.; McDonald, T. J.; Dean, W. L.; Reik, W.; Hill, D. J. Overexpression of insulin-like growth factor-II in transgenic mice is associated with pancreatic islet cell hyperplasia. *Endocrinology*. 140(5):2353-2363; 1999.
36. Pipeleers, D.; Hoorens, A.; Marichal-Pipeleers, M.; Van de Casteele, M.; Bouwens, L.; Ling, Z. Role of pancreatic beta-cells in the process of beta-cell death. *Diabetes* 50 Suppl 1:S52-57; 2001.

37. Rabinovitch, A.; Quigley, C.; Russel, T.; al., e. Insulin and multiplication stimulating activity (an insulin-like growth factor) stimulate islet α -cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures. *Diabetes* 31:160-164; 1982.
38. Robitaille, R.; Dusseault, J.; Henley, N.; Rosenberg, L.; Hallé, J. IGF-II allows prolonged blood glucose normalization with a reduced islet cell mass transplantation. *Endocrinology* 144(7):3037-3045; 2003.
39. Rutter, W. J. The development of the endocrine and exocrine pancreas. *Monogr Pathol* 21:30-38; 1980.
40. Scharp, D.; Lacy, P.; Ricordi, C.; Boyle, P.; Santiago, J.; Cryer, P.; Gingerick, R.; Jaffe, A.; Anderson, C.; Flye, W. Human islet transplantation in patients with type I diabetes. *Transplant Proc* 21(1 Pt 3):2744-2745; 1989.
41. Shapiro, A. M.; Ricordi, C.; Hering, B. J.; Auchincloss, H.; Lindblad, R.; Robertson, R. P.; Secchi, A.; Brendel, M. D.; Berney, T.; Brennan, D. C. and others. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 355(13):1318-1330; 2006.
42. Soon-Shiong, P.; Feldman, E.; Nelson, R.; Komtebedde, J.; Smidsrod, O.; Skjak-Braek, G.; Espevik, T.; Heintz, R.; Lee, M. Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets. *Transplantation* 54(5):769-774.; 1992.
43. Street, C. N.; Lakey, J. R.; Shapiro, A. M.; Imes, S.; Rajotte, R. V.; Ryan, E. A.; Lyon, J. G.; Kin, T.; Avila, J.; Tsujimura, T. and others. Islet graft assessment in the edmonton protocol: implications for predicting long-term clinical outcome. *Diabetes* 53(12):3107-3114; 2004.
44. Sun, Y.; Ma, X.; Zhou, D.; Vacek, I.; Sun, A. M. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J Clin Invest* 98(6):1417-1422.; 1996.

45. Tsao, M. S.; Duguid, W. P. Establishment of propagable epithelial cell lines from normal adult rat pancreas. *Exp Cell Res* 168(2):365-375; 1987.
46. Vrochides, D.; Paraskevas, S.; Papanikolaou, V. Transplantation for type 1 diabetes mellitus. Whole organ or islets? *Hippokratia* 13(1):6-8; 2009.
47. Winkler, R.; Pasleau, F.; Boussif, N.; Hodzic, D. [The IGF system: summary and recent data]. *Rev Med Liege* 55(7):725-739; 2000.

Figure Legends

Figure 1 *Evaluation of microencapsulated islet survival.*

■, islets encapsulated alone. □, islets encapsulated with 20 duct cells per capsule. ▒, islets encapsulated with 100 duct cells per capsule. **A.** Evaluation of islet viability using fluorescent dyes (AO/PI). The percentage of viable cells was obtained by the number of viable islets divided by the total number of islets in the sample then multiplying by 100 ($n \geq 3$). **B.** Assessment of the prevalence of apoptosis in cells encapsulated alone or with duct cells. The percentage of apoptotic cells was measured by the number of apoptotic cells divided by the total number of cells in the islet then multiplying by 100. Data are presented as mean \pm SEM, * $p < 0.001$.

Figure 2 *Evaluation of microencapsulated islet necrosis.*

■, islets encapsulated alone. □, islets encapsulated with 20 duct cells per capsule. ▒, islets encapsulated with 100 duct cells per capsule. **A.** The number of islets with central necrosis was divided by the total number of islets in the sample then multiplied by 100 ($n \geq 3$). **B.** The diameter of the surface area of central necrosis was measured with a calibrated scale and divided by the diameter of the whole islet ($n \geq 3$). Data are presented as mean \pm SEM.

Figure 3 *In vivo studies*

■, islets encapsulated alone ($n=5$). ▲, islets encapsulated with 100 duct cells per capsule ($n=7$). Islets encapsulated alone (150 IEQs) or with duct cells were implanted into the peritoneal cavity of diabetic *scid* mice, the blood glucose level was monitored and the results were expressed as the percentage of normoglycemic mice. Data are presented as percentage of normoglycemic mice (%). γ : $p < 0.01$

Figures

Figure 1

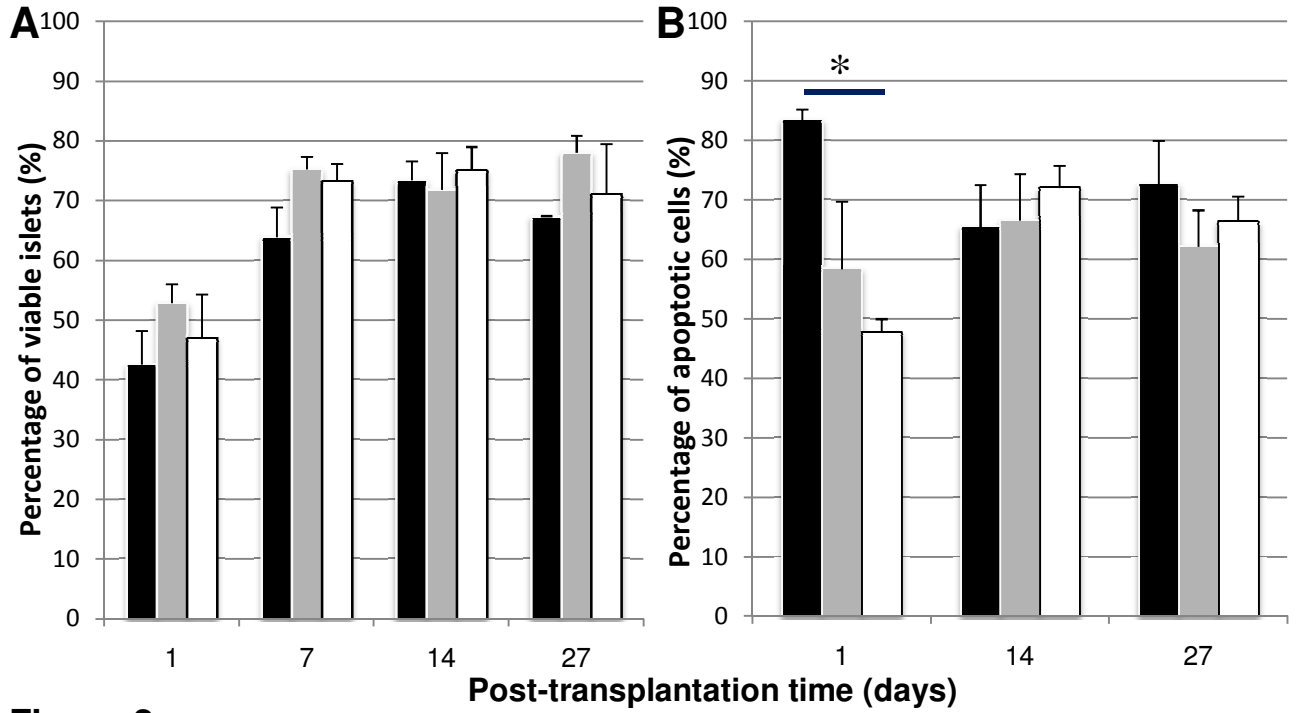


Figure 2

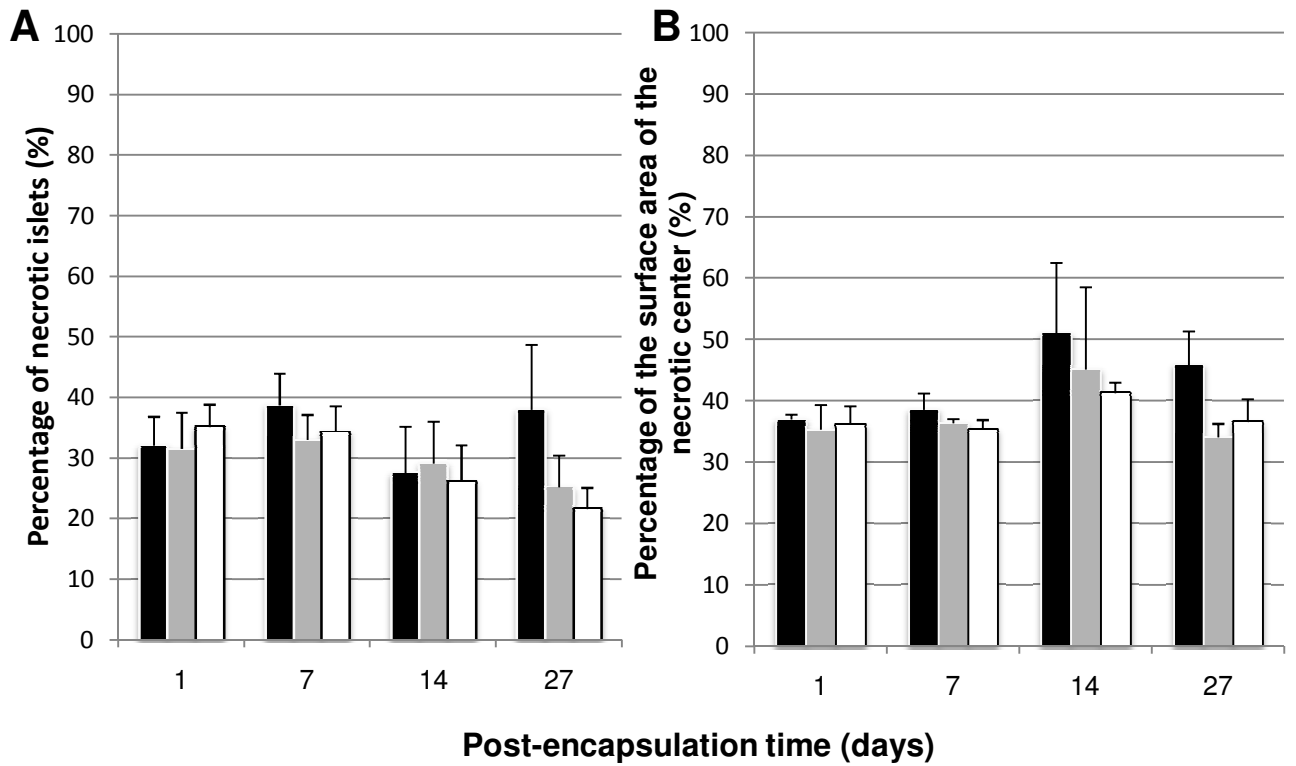
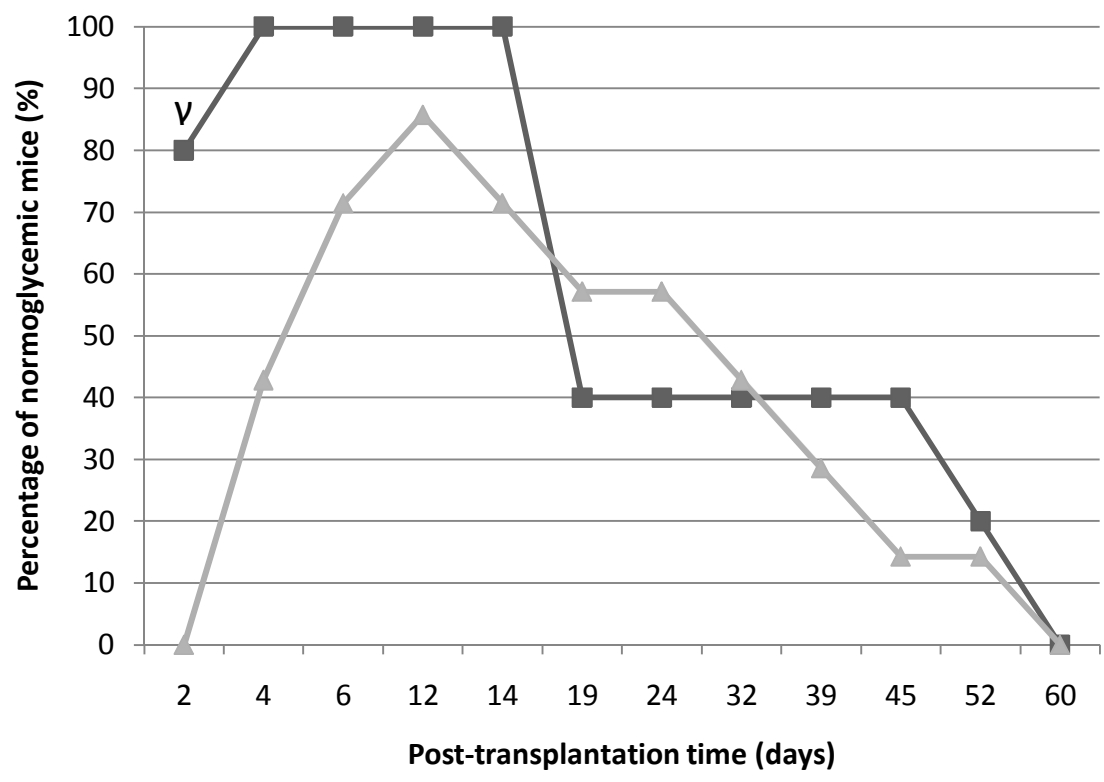


Figure 3



D.2.1 Résultats complémentaires

Légende des figures supplémentaires

Figure 1. *Identification de l'identité des cellules canaliculaires pancréatiques isolées de souris à l'aide de la cytokératine 7 et de l'IGF-II*

A. Contrôle négatif de cellules canaliculaires de souris (i.e. non-exposées à l'anticorps primaire de la cytokératine 7). À noter qu'il n'y a aucune coloration brune due au chromogène DAB. Photo prise avec une amplification de 25X. (n=6)

B. Identification de la cytokératine 7 au passage 12. (Images représentatives de celles obtenues pour d'autres passages dans le temps). À noter que les cellules sont brunes en raison de la transformation du DAB par la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire. Un agrandissement de 25X a été utilisé. (n=6)

C. Passage 19. À noter que ces cellules sont beaucoup plus confluentes que celles représentées en A et B. Images obtenues grâce à un agrandissement de 25X. (n=6)

D. Contrôle négatif de cellules canaliculaires marquées avec un anticorps primaire contre l'IGF-II. À noter que les noyaux des cellules sont colorés bleus par l'utilisation d'un DAPI fluorescent. Photo prise avec une amplification de 20X. (n=4)

E. Identification de l'IGF-II au passage 18. (Images représentatives de celles obtenues pour d'autres passages dans le temps). Photo prise avec une amplification de 25X. (n=4)

Figure 2. *Identification de la présence de cellules β dans les cultures de cellules canaliculaires pancréatiques isolées de souris*

A. Contrôle positif de l'identification de cellules β sur un pancréas de souris. Image obtenue grâce à un agrandissement de 10X. À noter que seuls les îlots sont

colorés. (n=3) **B.** Identification de la présence de cellules β sur des cellules canaliculaires du passage 16. (Images représentatives de celles obtenues pour d'autres passages dans le temps). À noter qu'il n'y a aucune cellule positive pour l'insuline. Image obtenue à 10X. (n=3).

Figure 3. *Évaluation de la viabilité et fonction des cellules canaliculaires encapsulées*

■ . Cellules encapsulées à 20 cellules par capsule ■ . 100 cellules par capsule
Utilisation du test MTS afin d'évaluer la viabilité et la fonction des cellules canaliculaires encapsulées à des concentrations de 20 ou 100 cellules par capsule aux jours 1, 7, 14 et 27 post-encapsulation. (n ≥ 3) *, p < 0.0001 ; **, p < 0.05

Figure 4. *Évaluation de la viabilité d'îlots de Langerhans encapsulés avec des cellules canaliculaires de souris en fluorescence grâce aux fluorochromes acridine orange (AO) et iodure de propidium (PI)*

Identification de la viabilité d'îlots co-encapsulés à l'aide de deux colorants fluorescents. À noter que cet échantillon possède les 5 'grades' de viabilité (100% viable (vert), 75 % viable (vert-vert-rouge), 50% viable (vert-rouge), 25% viable (rouge-rouge-vert) et 100% mort (rouge)) et qu'ils sont identifiés par une flèche de la même combinaison de couleurs. Également, on peut apercevoir des points lumineux de couleur vert foncé et pâle qui représentent les cellules canaliculaires co-encapsulées.

Figure 5. *Évaluation du milieu de culture le plus adapté pour la culture d'îlots de Langerhans co-encapsulés avec des cellules canaliculaires pancréatiques*

◆ : CMRL. ■ : IMEMZO. **Îlots encapsulés A.** Viabilité, par une coloration AO/PI, d'îlots encapsulés cultivés soit dans le milieu de culture prescrit pour les cellules canaliculaires (IMEMZO) ou leur milieu (CMRL) aux jours 1, 7, 14 et 27 post-encapsulation. Aucune différence significative. **B.** Évaluation du pourcentage qu'occupe le centre de nécrose chez les îlots nécrotiques par observations microscopiques aux jours 1, 7, 14 et 27 post-encapsulation. Aucune différence significative. **Cellules canaliculaires non-encapsulées cultivées *in vitro* C.** Décompte cellulaire en fonction du temps (jour 0, 6, 17 et 31) pour une culture dans deux milieux de culture différents (i.e. CMRL ou IMEMZO). ($n \geq 4$) *, $p < 0.0001$ **D.** Évaluation de la viabilité par une coloration au bleu de Trypan en fonction du temps et ce pour les deux milieux de culture. ($n \geq 4$) *, $p < 0.0001$

Figure 6. *Évaluation du pourcentage d'îlots co-encapsulés morts par apoptose grâce au TUNEL assay*

A. Îlot encapsulé coloré en rouge s'il y a présence de cellules apoptotiques. À noter que l'îlot possède 50% de cellules rouges (apoptotiques). (Image servant d'exemple pour un îlot jugé 50% apoptotiques et où chaque photo obtenue a servi à calculer le pourcentage de cellules apoptotiques sur le total de cellules visibles dans l'îlot) Représentation obtenue avec un objectif de 63X. ($n \geq 3$) **B.** Îlot encapsulé présentant 100% de cellules apoptotiques (rouges). Photo prise à 63X. ($n \geq 3$)

Figure 1

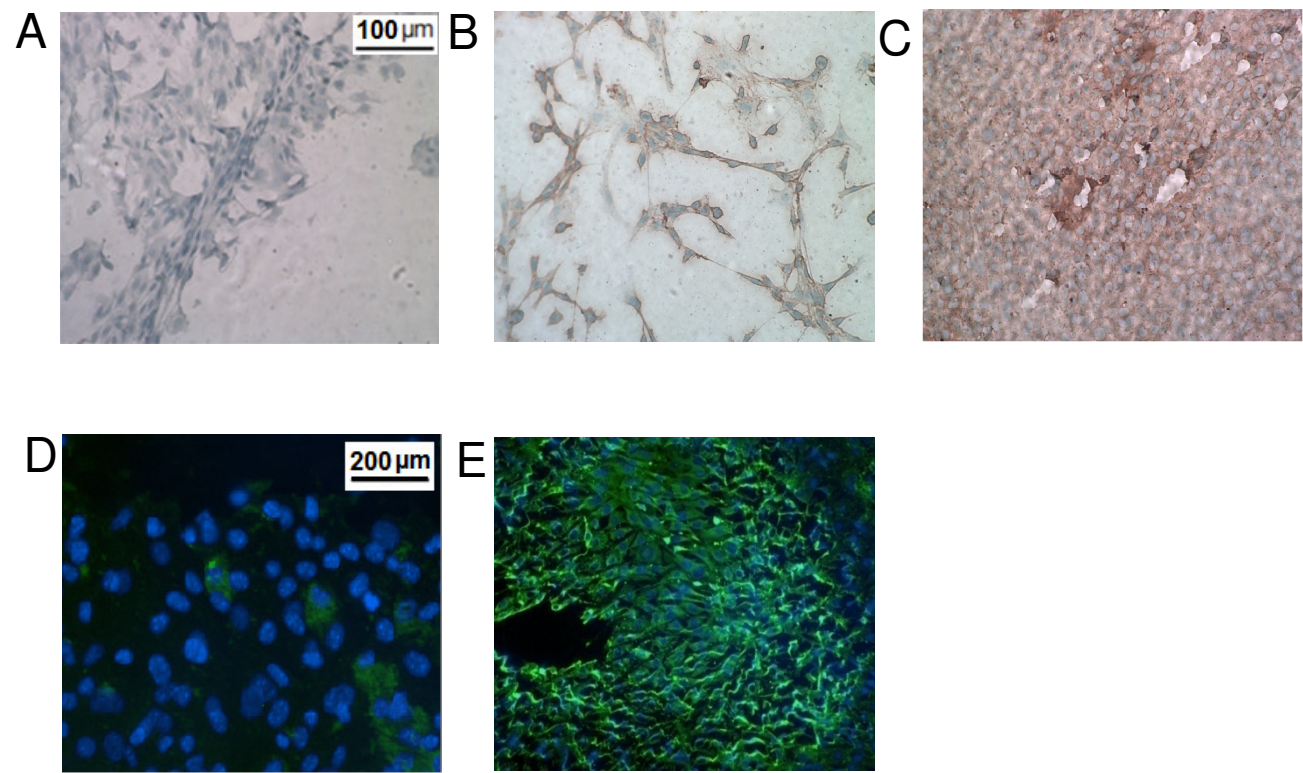


Figure 2

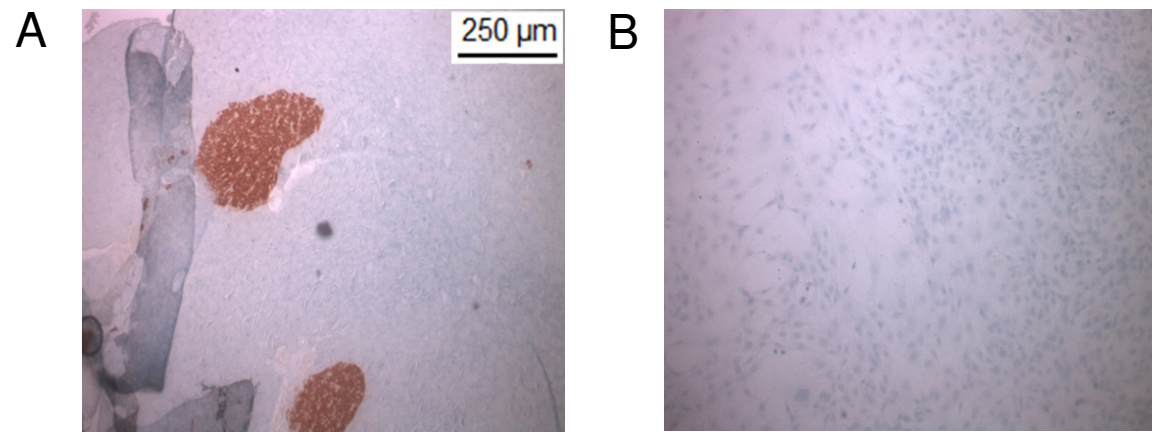


Figure 3

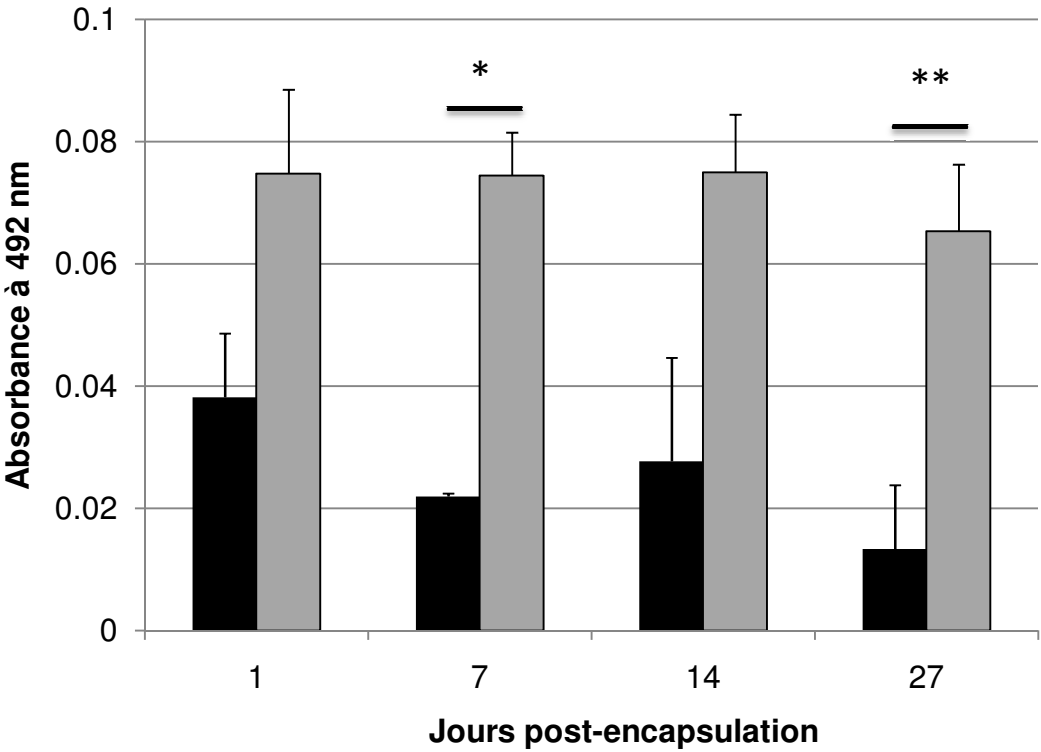


Figure 4

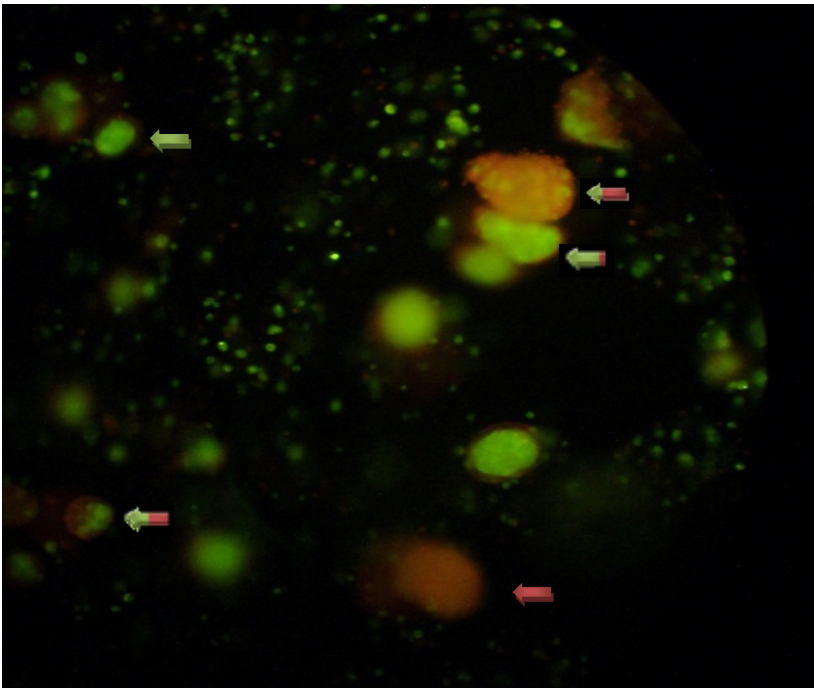


Figure 5

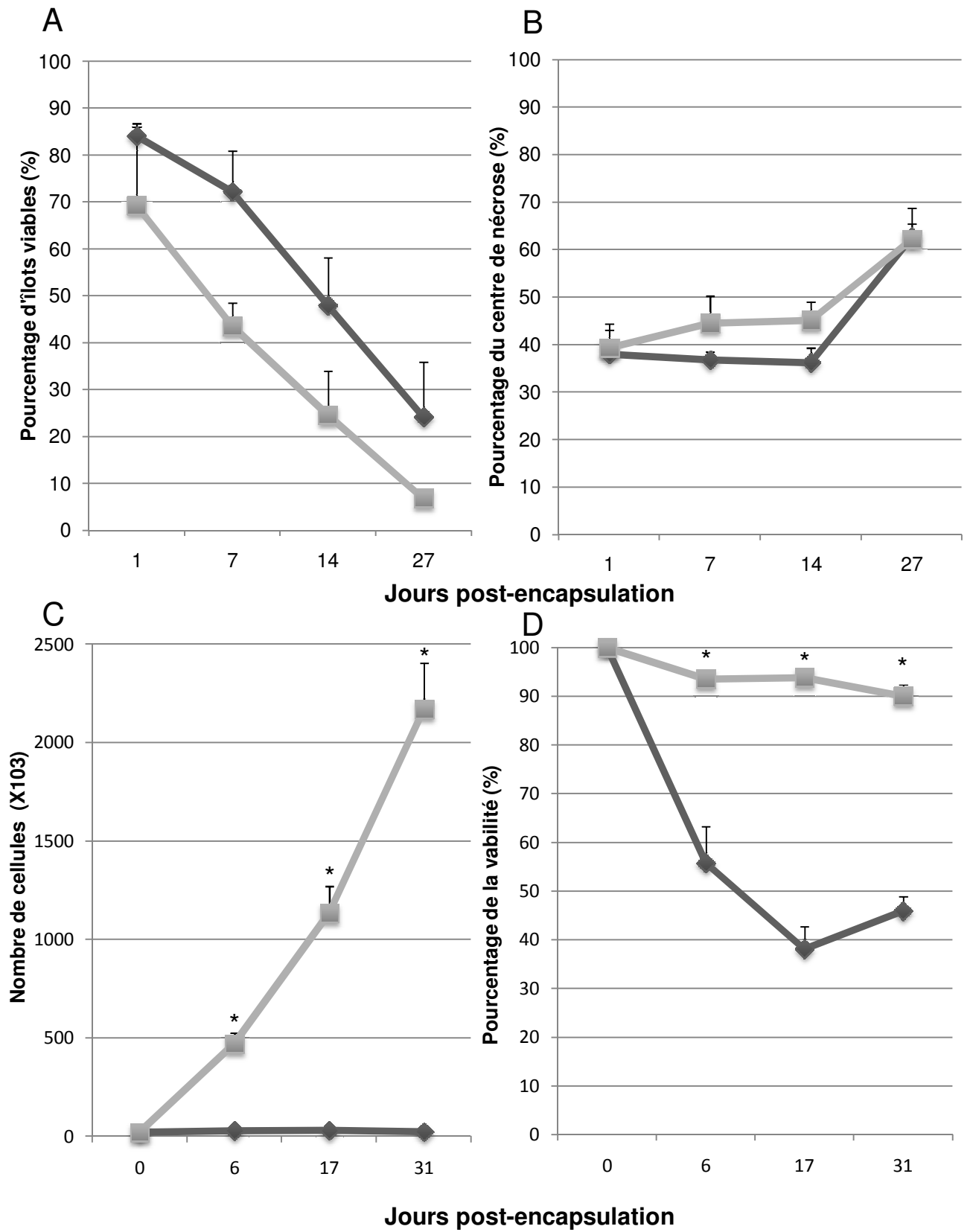
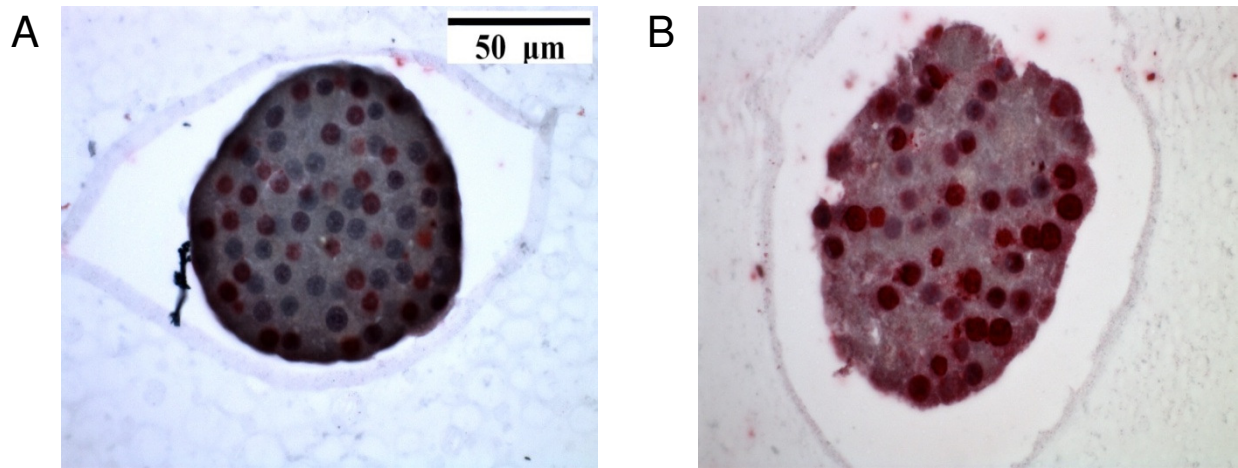


Figure 6



E. Discussion

E.1 Biocompatibilité

Plusieurs études [115, 152, 162, 165-167, 262-264] ont investigué le rôle des contaminants de l'alginate et l'effet bénéfique de différentes méthodes de purification sur l'immunogénicité des microcapsules à base d'alginate. Cependant, à l'exception des études de Zhang [265] et de Korbitt [266] discutées plus bas, aucune étude n'a évalué les effets directs des contaminants sur la viabilité et la fonction des cellules encapsulées. La première partie de mes travaux (voir étude **D.1**) a consisté à comparer la survie et la fonction d'îlots de Langerhans microencapsulés dans de l'alginate purifié ou non-purifié.

Différentes analyses furent faites aux jours 1, 4, 7, 14 et 27 post-encapsulation concernant la viabilité des îlots, le niveau d'incidence de mort cellulaire par nécrose et apoptose et leur fonction sécrétoire d'insuline. À l'aide d'une coloration utilisant deux composés fluorescents (AO/PI), nous avons obtenu une plus grande proportion d'îlots viables lorsque l'alginate purifié est utilisé et des différences significatives aux jours 1 et 14. Ainsi, on peut conclure que les contaminants présents dans l'alginate non-purifié affectent la viabilité des îlots, et ce même au premier jour. De plus, la diminution progressive dans le temps de ce pourcentage est observée dans les deux groupes expérimentaux et peut être expliqué par un effet de l'isolation et/ou un manque d'un facteur trophique nécessaire au maintien de leur survie. À l'aide d'observations microscopiques, on obtint un pourcentage significatif plus important d'îlots présentant un centre de nécrose aux jours 1, 4, 7 et 14 post-encapsulation lorsque l'alginate impur est utilisé. De plus, on peut remarquer, dans les cas de l'alginate purifié et non-purifié, que ce chiffre augmente avec le temps jusqu'à devenir similaire au dernier jour d'étude (i.e. jour 27). Ainsi, ce résultat tend à corroborer la diminution progressive de viabilité observée ultérieurement. On peut de cette façon proposer un rôle des

contaminants dans l'induction de la nécrose des îlots encapsulés qui jusqu'à présent était uniquement imputée aux réactions péricapsulaires. Le degré de nécrose fut également évalué par une mesure du pourcentage occupé par les centres nécrosés. Dans ce cas, on obtient également des chiffres plus élevés lorsque l'alginate impur est utilisé; la différence étant significative aux jours 7 et 14. De plus, le centre de nécrose semble augmenter en proportion dans le temps, tout comme celui des îlots encapsulés dans de l'alginate purifié. L'incidence de l'apoptose fut également investiguée par le test du TUNEL (*IdT dUTP nick end labelling*). En fait, on obtient un pourcentage plus élevé de cellules apoptotiques lorsque l'alginate non-purifié est utilisé contrairement à celui purifié. Ces résultats viennent ainsi impliquer l'apoptose dans le mécanisme de mort cellulaire des îlots encapsulés. Finalement, la fonction de sécrétion d'insuline fut investiguée au jour 14 en raison de différences de survie et de nécrose significatives. Il est connu qu'un îlot viable (i.e. fonctionnel) peut sécréter une plus grande quantité d'insuline lorsqu'il est soumis à une stimulation (i.e. glucose) contrairement à un îlot nécrotique. Les index de stimulation furent plus élevés lorsque l'alginate purifié était utilisé et ce dans les deux situations expérimentales : stimulation avec glucose ou glucose et théophylline. Cette dernière fut employée en raison de sa capacité à potentialiser les effets du glucose. On peut donc conclure que les contaminants de l'alginate diminuent la viabilité des îlots, augmentent l'incidence de nécrose et d'apoptose et influencent leur sécrétion d'insuline.

En 2001, le groupe de Zhang investiga brièvement l'effet de l'alginate non-purifié sur la survie d'îlots encapsulés. Ainsi, ils comparèrent deux types d'alginate disponibles commercialement, une préparation pure (Pronova UPLVG) et une non-purifiée (Keltone LV), et obtinrent des résultats *in vitro* de viabilité et de sécrétion d'insuline semblables pour les deux groupes après 2 jours de culture. Par la suite, ils implantèrent leurs préparations chez des souris BALB/C puis regardèrent le degré de fibrose et la survie des îlots après quatre semaines. Ils observèrent une plus grande réaction péricapsulaire et une viabilité diminuée lorsque l'alginate

impur était utilisé. Ils conclurent ainsi que l'alginate purifié diminuait significativement la réaction immune et améliorait la survie de l'îlot. Ainsi, les auteurs attribuèrent à la réaction immunitaire du receveur la cause de la survie limitée des îlots *in vivo* plutôt qu'à une action directe des contaminants sur les îlots. Cependant, ces études *in vivo* ne permettent pas de distinguer clairement le rôle de ces deux mécanismes. D'autre part, ils obtinrent des résultats *in vitro* opposés à ceux obtenus dans l'étude **D.1**, soit que la contamination/purification de l'alginate n'a aucun effet direct sur la survie. À notre avis, cette discordance s'explique par le fait que leur étude *in vitro* n'a été effectuée que sur une courte période de temps, soit après deux jours en culture. Dans notre étude, il a fallu un temps plus long avant de pouvoir conclure des effets directs de l'alginate non-purifié.

L'étude **D.1** a permis d'investiguer précisément les effets de l'alginate non-purifié sur la survie d'îlots encapsulés en remédiant aux différentes lacunes de l'étude de Zhang. En fait, les expériences ont été conduites *in vitro* afin d'éliminer l'effet de l'hôte (i.e. réaction péricapsulaire) qui peut affecter grandement la survie de l'îlot puisqu'une fibrose empêche l'entrée des nutriments, de l'oxygène et la sortie des déchets cellulaires. Ceci permettra de s'assurer que les effets remarqués sont exclusivement dus à l'effet direct sur les îlots et non à la réaction de l'hôte. De plus, la viabilité et la mort cellulaire des îlots ont été étudiées sur plusieurs jours afin d'évaluer adéquatement la répercussion et l'incidence à long terme des effets des différentes préparations d'alginate utilisées pour l'encapsulation des îlots. La fonction des îlots fut investiguée au jour 14 post-encapsulation en raison d'effets plus marqués sur la viabilité et les morts cellulaires des îlots. Zhang l'évalua suite à deux jours de culture où il n'est pas certain que les contaminants aient eu le temps d'affecter la survie des îlots. De plus, ils utilisèrent un alginate purifié commercialement potentiellement contaminé; tandis que l'étude **D.1** fut conduite avec de l'alginate purifié selon une méthode évaluée dans notre laboratoire. Il a été prouvé que celle-ci produit un alginate avec une proportion faible en protéines, endotoxines et polyphénols [162]. Ceci permet

donc d'obtenir des résultats plus fiables lorsqu'on compare les effets des deux alginates car on peut s'assurer que la préparation dite pure le sera. De plus, l'étude **D.1** permet de conclure que la fonction était également compromise à long terme tandis que Zhang investigua simplement leur viabilité. Une conclusion commune à l'article de Zhang et au nôtre est que l'alginate purifié permet un maintien plus adéquat de la survie des îlots encapsulés.

En 2009, une seconde étude investigua les effets d'une purification d'alginate sur la survie et la fonction à long terme d'îlots de souris [266]. Cependant, le protocole de purification utilisé par Mallet *et al.* est différent de celui de l'étude **D.1** par l'absence des extractions au chloroforme (CHCl_3), de l'incubation en présence de charbon neutre, de la formation de billes au chlorure de baryum (BaCl_2) et des dialyses contre la saline. De plus, leur analyse des deux préparations indique que le niveau d'endotoxines présentes est inchangé suite à la purification tandis que la proportion de protéines et polyphénols n'est pas indiquée. Suite à leur transplantation dans des souris diabétiques induites à la streptozotocine, ils obtinrent un taux de fibrose péri capsulaire plus élevé avec les capsules formées avec de l'alginate non-purifié. Ils conclurent donc que l'alginate purifié permettait une diminution de la réaction immunitaire mais également que leurs îlots étaient plus viables. Cette dernière affirmation prend origine dans le fait que leurs îlots encapsulés avec la préparation purifiée permettaient un meilleur maintien de la glycémie à long terme et que lorsqu'implantés, les souris répondaient mieux au test oral de tolérance au glucose (oral glucose tolerance test; OGTT). De plus, ils obtinrent une plus grande proportion d'îlots nécrotiques avec la préparation impure et nécessairement une moins grande sécrétion d'insuline suite à un test statique de stimulation au glucose. Cependant, la même ambiguïté reste présente qu'avec l'étude de Zhang. En fait, Mallett conclut, par des expériences *in vivo*, que l'alginate purifié permet une meilleure survie de l'îlot à long terme. Cependant, ils nuancent leurs résultats en les expliquant soit par l'effet de la fibrose péri capsulaire, qui est nécessairement impliqué dans cette diminution

de survie, ou par l'effet direct de l'alginate sur les îlots. Ainsi, ils admettent ne pouvoir se prononcer sur les mécanismes de l'amélioration de la survie, à savoir si celle-ci est attribuable à un effet sur le greffon ou sur l'hôte.

Ce dernier aspect vient souligner l'originalité de l'étude **D.1**. En effet, le protocole expérimental de cette étude permet de déduire que les contaminants ont un effet toxique direct sur les îlots, en plus de leur effet sur la réaction de l'hôte.

Mallett *et al.* découvrirent également que leur protocole de purification augmentait légèrement la proportion de blocs G connus pour favoriser une capsule plus stable [267]. Ceci leur permet de conclure que leur alginate purifié diminue le pourcentage de capsules endommagées et ainsi la reconnaissance des îlots par le système immunitaire de l'hôte. Certaines études supportent également que la proportion de blocs G permet de prédire l'immunogénicité de l'alginate [101, 268]. Cependant, cette comparaison moléculaire n'a pas encore été investiguée avec le protocole de purification amélioré dans notre laboratoire et utilisé pour l'étude **D.1**. En fait, le ratio G/M semble dépendre plus du type d'alginate (i.e. de l'espèce d'algue dont l'alginate est extrait) que de la méthode de purification.

Les mécanismes d'action des différents contaminants restent encore à clarifier. Cependant, certains groupes ont clairement démontré les actions directes du LPS (i.e. endotoxines) sur les cellules encapsulées. En fait, les endotoxines stimuleraient la production, par l'îlot, de cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF- α) [157] et de NO [269, 270]. Concernant les polyphénols présents dans les plantes, il a été prouvé qu'ils pouvaient activer l'oxyde nitrique synthase (NOS) chez les cellules endothéliales par l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire et l'induction de la voie PI3 kinase/Akt [271-273]. L'activation de cet enzyme viendrait ainsi contribuer à la production intra-îlot d'oxyde nitrique, toxique tout comme les endotoxines. Cependant, cette théorie n'a pas été validée dans le cas de l'alginate. Finalement, aucun mécanisme précis n'a été suggéré concernant les protéines.

Plus récemment, un groupe d'Australie observa, suite à une implantation d'une durée de 16 mois chez des patients diabétiques, une réaction fibrotique et un important pourcentage de nécrose des îlots encapsulés [274]. Ainsi, malgré les plus récentes percées en termes de purification d'alginate, il semble que le protocole universel ne soit pas encore tout à fait au point. De plus, il s'avère qu'un même protocole de purification occasionne des résultats différents dépendamment des laboratoires ou du lot d'alginate brut utilisé. Ceci explique le besoin urgent de proposer un protocole facilement reproductible et permettant la synthèse d'un alginate hautement biocompatible pour l'hôte et le greffon; ce dernier aspect négligé jusqu'à maintenant et mis en valeur par l'étude **D.1**.

Il a été clairement démontré que les contaminants présents dans l'alginate affectent la survie et fonction d'îlots encapsulés mais également que les études *in vivo* ne peuvent servir à déterminer avec certitude les différents mécanismes responsables de la mort cellulaire des îlots encapsulés. De plus, on peut conclure qu'un polymère susceptible d'être utilisé avec des cellules encapsulées devra être purifié selon un protocole adéquat, afin de maximiser la biocompatibilité du matériau avec l'hôte et le greffon, et que son développement devra dorénavant inclure des analyses de survie du transplant *in vitro* et *in vivo*.

E.2. Co-encapsulation des îlots et cellules canaliculaires

La viabilité étant réduite lorsque les îlots sont isolés, plusieurs groupes imaginèrent des moyens afin d'améliorer cet aspect : co-incubation de cellules non-endocrines [210, 211, 216], de générateurs d'oxygène [198] ou de molécules spécifiques [192, 193]. De plus, plusieurs études investiguèrent l'opportunité d'utiliser les cellules canaliculaires pancréatiques pour améliorer la survie des îlots fraîchement isolés [231, 232, 254, 275]. Cependant, l'étude **D.2** est originale par son utilisation, pour la première fois, d'une co-encapsulation de ces cellules avec des îlots dans le but d'améliorer la survie et fonction de ces derniers.

Plusieurs explications plausibles des résultats obtenus seront discutées dans la section suivante ainsi que différents éléments de la littérature. Ainsi, l'utilisation de cellules dispersées (et non de cysts), d'un milieu de culture liquide (au lieu de collagène extrait de queues de rat) [231, 232] et de la température physiologique (37 °C) [254] peuvent expliquer les différents résultats *in vitro* pour des îlots encapsulés que non-encapsulés. Cependant, seule l'utilisation de cellules dispersées ainsi que de la température physiologique peuvent expliquer également les résultats *in vivo*. De plus, il a été prouvé que les cellules canaliculaires peuvent sécréter différentes cytokines inflammatoires lorsqu'elles sont stimulées par d'autres cytokines [258, 276]. Ce facteur ne peut expliquer que les résultats *in vivo* mais s'applique tant pour les îlots encapsulés que non-encapsulés.

Premièrement, l'étude **D.2** consiste à isoler des cellules canaliculaires de souris et à confirmer la pureté et l'identité de la culture grâce à l'identification de la cytokératine 7 et de l'insulin-like growth factor II' (IGF-II). La viabilité des cellules canaliculaires encapsulées fut également évaluée à différents jours à l'aide du test MTS (voir section **D.2.1** résultats complémentaires - figure 3). Par la suite, la viabilité, mort cellulaire et fonction des îlots furent évalués *in vitro* suite à leur encapsulation seuls ou avec deux différentes concentrations de cellules canaliculaires (i.e. 20 ou 100 cellules par bille). L'analyse de la viabilité, par une

coloration à l'acridine orange (AO) et iodure de propidium (PI), permet de suggérer que l'utilisation de cellules canaliculaires n'améliore pas la survie des îlots, comparativement aux îlots seuls, en raison de différences non-significatives à chacun des jours de l'étude (i.e. jours 1, 7, 14 et 27 post-encapsulation) entre les trois groupes. Des résultats similaires furent obtenus lors de l'analyse du pourcentage d'îlots nécrotiques, par des observations microscopiques, et celle de la superficie occupée par ce centre nécrotique. Dans les conditions expérimentales utilisées, l'hypothèse selon laquelle la co-encapsulation de cellules canaliculaires améliore la survie de l'îlot n'a pas été confirmée. Cependant, l'incidence de mort cellulaire par apoptose révèle une différence significative, entre les îlots encapsulés seuls et ceux encapsulés avec 100 cellules par capsule, au premier jour post-encapsulation ($p < 0.001$). Il semblerait ainsi que ces cellules peuvent diminuer légèrement l'apoptose des îlots au jour 1 mais que ces effets ne persistent pas dans le temps. Cependant, ceci ne serait pas expliqué par une diminution de la viabilité des cellules canaliculaires encapsulées (voir section **D.2.1** résultats complémentaires - figure 3). De plus, les résultats obtenus pour la viabilité des îlots encapsulés seuls ($42.6 \pm 5.6\%$) et ceux de leur apoptose ($83.5 \pm 1.7\%$) diffèrent. Ceci pourrait être expliqué par un nombre insuffisant d'îlots analysés et des tests qualitatifs. Finalement, afin d'évaluer si cette co-encapsulation améliore la normalisation de glycémies *in vivo*, des souris SCID furent implantées avec 150 IEs d'îlots encapsulés seuls ou avec la concentration la plus élevée de cellules canaliculaires. Cette étude dura 60 jours et seule une différence significative au tout début (jour 2 post-transplantation) fut observée entre les deux groupes expérimentaux quand les îlots encapsulés seuls ont normalisé plus rapidement la glycémie des souris SCID ($p < 0.05$). Ceci implique que les cellules ne sont pas suffisantes pour améliorer à long terme la fonction des îlots et influencer la récurrence de la maladie.

Le modèle expérimental *in vivo* comprend l'utilisation de souris immunodéficientes (i.e. SCID) afin d'empêcher la potentielle reconnaissance des

billes par le système immunitaire de la souris et d'ainsi créer une fibrose péri capsulaire capable d'influencer la viabilité des îlots, et même celle des cellules canaliculaires. De cette façon, ce modèle permet l'élimination d'un facteur confondant, soit la réaction de l'hôte, et évalue exclusivement une fonction non-compromise des îlots. Également, la concentration la plus élevée de cellules canaliculaires (i.e. 100 cellules par bille) fut utilisée lors des expériences *in vivo* afin de maximiser leurs possibles bienfaits.

Il a déjà été prouvé par le passé que des îlots de rats pouvaient normaliser la glycémie de souris [238]; rendant possible ainsi cette xénotransplantation. Il est également connu que l'IGF-II est très bien conservé entre les espèces [277]. De plus, sa séquence moléculaire ne diffère que de deux acides aminés lorsqu'on compare celles de la souris et du rat [278] permettant ainsi une homologie de 98% entre les deux espèces [279]. Cependant, l'utilisation de cellules canaliculaires de souris avec des îlots de rat pourrait influencer malgré tout les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*.

Plusieurs études antérieures ont été menées afin d'évaluer les effets des cellules canaliculaires sur la survie d'îlots de Langerhans. Cependant, elles ont été menées avec un modèle non-encapsulé; une différence somme toute majeure. Il est important à noter qu'encore à ce jour, les effets de la matrice d'alginate sur les contacts cellule-cellule ne sont pas complètement élucidés.

Les études du groupe de Rosenberg démontrent une amélioration de la réplication cellulaire, de la viabilité et une diminution de la mort cellulaire des îlots par une co-incubation avec les cellules canaliculaires [231, 232]. Cependant, leur modèle expérimental incluait l'utilisation de cysts isolés de hamster qui pouvaient être en contact direct avec les îlots. En fait, ils utilisèrent dans toutes leurs études un gel de collagène extrait de queues de rats afin de cultiver leurs îlots et cysts. Ce système permet entre-autre de favoriser un maintien adéquat des fonctions de sécrétion des îlots, une réorganisation des îlots isolés [182] et la promotion de la

prolifération cellulaire [280]. Cette avenue ne fut pas utilisée concernant notre étude **D.2** où l'encapsulation était étudiée sans l'ajout de molécules extérieures.

De plus, Rosenberg *et al.* identifièrent le facteur de croissance IGF-II dans le milieu de sécrétion de leurs cellules (34 ng/ml) et confirma, *in vitro*, des effets significatifs d'une culture d'îlots d'hamster avec cette même concentration d'IGF-II. Ils conclurent ainsi que les cellules canaliculaires amélioraient la survie des îlots et que ceci se produisait par leur production paracrine d'IGF-II. Cependant, notre groupe reprit cette expérience *in vitro* et évalua la viabilité d'îlots de rat encapsulés après 6 jours en culture avec différentes concentrations d'IGF-II variant entre 0 et 500 ng/ml. Seule une différence statistiquement significative fut observée lorsqu'on compare la viabilité obtenue suite à une incubation avec 500 ng/ml d'IGF-II et celle à 0 ng/ml, puis avec celle avec 50 ng/ml d'IGF-II ($p < 0.01$ et $p < 0.05$; respectivement) [238]. Ces mêmes effets furent remarqués avec l'incidence de l'apoptose et la superficie occupée par le centre nécrotique. Ainsi, il semblerait qu'une quantité importante de ce facteur de croissance soit nécessaire afin d'obtenir des effets sur la survie d'îlots encapsulés, contrairement à ceux non-encapsulés. Cette constatation serait une plausible explication concernant les résultats obtenus par notre groupe. En fait, il se pourrait que la sécrétion d'IGF-II soit modifiée, ou insuffisante, lorsque les cellules canaliculaires sont encapsulées ou que la quantité de cellules de base nécessaire n'ait pas été utilisée. Dans l'étude **D.2**, 100 cellules par capsule représentent la concentration maximale utilisée. À ce niveau, la majorité de la capsule est occupée par l'îlot et/ou les cellules canaliculaires. De cette façon, il faudra probablement utiliser une capsule d'un plus gros calibre afin d'encapsuler un plus grand nombre de cellules ou utiliser un sécrétagogue de l'IGF-II afin d'améliorer la survie des îlots par cette voie.

Une étude, réalisée en 2003 par un groupe d'Italie, investiga l'utilisation de cellules canaliculaires pancréatiques humaines pour améliorer la fonction

sécrétoire (i.e. index de stimulation d'insuline; ISI) d'îlots d'humains aux jours 1 et 14 et poussèrent plus loin leurs études en évaluant l'impact de la température (33°C ou 37°C) sur cette coculture *in vitro* [254]. En fait, ils utilisèrent deux modèles expérimentaux : le premier étant une préparation fraîche de cellules (3500 cellules/ml) et d'îlots (20 îlots/cm²) et le deuxième évaluant l'effet de la cryopréservation (-90°C) sur les îlots (10 000 îlots) et la présence de cellules canaliculaires (15 000 cellules) suite à leur dégel. À noter que les cellules étaient congelées en même temps que les îlots, mais séparément. Concernant les résultats de la préparation 'fraîche', ils obtinrent un effet significatif de cette coculture sur la sécrétion d'insuline des îlots au jour 14 à 33°C mais non à 37°C. De plus, aucune différence ne fut remarquée au jour 1 pour la préparation fraîche entre les groupes expérimentaux et ce pour les deux températures testées. De cette façon, il semblerait que les cellules canaliculaires, à l'état frais, doivent être incubées à 33°C pour affecter la fonction d'îlots humains à long terme. Concernant la préparation cryopréservée, la co-incubation permet l'obtention d'un ISI significativement plus élevé aux jours 1 et 14 et ce pour les 2 températures testées. Ces expériences permirent de conclure que l'utilisation de ces cellules, suite à leur décongélation et indépendamment de la température, permettent un meilleur maintien de la fonction des îlots décongelés; mais également que ces cellules semblent mieux fonctionner à 33°C à l'état frais. Ce dernier aspect pourrait expliquer les résultats obtenus à long terme dans l'étude **D.2** où la température de culture était de 37°C. Cependant, des études préliminaires démontrèrent qu'à 37°C, nos cellules canaliculaires présentaient une très bonne croissance et un fort taux de viabilité (≈80-90%) (voir section **D.2.1** résultats complémentaires - figure 5C et D); et la plupart des études antérieures, qui évaluaient les effets des cellules canaliculaires sur des îlots de Langerhans isolés, utilisaient une température de 37°C. De plus, cette température fut choisie afin de recréer un environnement physiologique. Toutefois, leurs résultats à l'état frais au jour 1 à 37°C concordent également avec nos résultats obtenus au même jour.

Plus récemment, le groupe de Korbitt identifia une corrélation importante selon laquelle une forte proportion de cellules canaliculaires présentes dans une préparation d'îlots influence positivement la normalisation de la glycémie *in vivo* [281]. Ces résultats viennent corroborer l'idée de d'autres groupes concernant l'avantage d'utiliser les cellules canaliculaires directement avec les îlots [231, 232, 254]. En fait, Korbitt *et al.* suggèrent qu'un progéniteur cellulaire serait présent dans les préparations impures d'îlots (i.e. comportant d'autres types cellulaires pancréatiques) et que celui-ci permettrait le renouvellement des cellules β et améliorerait la survie à long terme des îlots transplantés. De plus, ils proposent que les cellules canaliculaires pancréatiques soient fort probablement ce progéniteur. De cette façon, Korbitt *et al.* démontrèrent une corrélation entre la proportion de cellules canaliculaires et l'amélioration de la glycémie *in vivo*. Ils n'ont trouvé une telle corrélation avec aucune des autres cellules pancréatiques; ceci expliquant qu'ils soulignent l'intérêt d'identifier plus concrètement le progéniteur potentiel de cellules β .

Nos résultats obtenus sont également corroborés par une récente étude qui investiga les effets *in vitro* d'une coculture d'îlots humains avec des cellules canaliculaires humaines mais également de leur potentiel *in vivo* à améliorer la glycémie chez des souris diabétiques [275]. Tout d'abord, ils évaluèrent *in vitro* la viabilité d'îlots (3000 IEs) cultivés 48 heures avec des cellules canaliculaires et n'obtinrent aucune différence significative. Cette étude démontra des résultats *in vitro* similaires à notre étude. C'est à dire qu'aucune différence significative ne fut observée avec les différents tests de viabilité lorsque des cellules canaliculaires étaient utilisées. Par la suite, ils implantèrent des concentrations d'îlots de 2000 et 1000 IEs seuls ou avec 3×10^6 cellules canaliculaires chez des souris diabétiques et n'obtinrent aucune différence concernant le taux ou le temps de normoglycémie. Aucune explication ne fut proposée pour ces résultats. Ces observations corroborent les résultats de notre étude *in vivo* où la normalisation des glycémies n'était pas différente selon nos deux groupes expérimentaux (i.e. îlots encapsulés

seuls ou avec cellules canaliculaires). Il faut noter que dans les deux études, incluant le groupe transplanté avec le plus petit nombre d'îlots (1 000 IEs) dans l'étude d'Ichii, les souris du groupe contrôle ont maintenu une glycémie normale, ce qui rend difficile la démonstration de l'efficacité de l'intervention proposée (co-encapsulation avec des cellules canaliculaires). Il est intéressant de noter que ce groupe a également choisi un modèle de souris immunodéficientes (nu/nu) pour leurs expérimentations comme notre groupe (souris SCID).

Plusieurs études, telles que discutées plus haut, soutenaient notre hypothèse et les présents résultats obtenus étaient inattendus. Une explication plausible serait que l'hypothèse de départ soit erronée. En effet, il se pourrait que les bienfaits de ces cellules soient annulés par leur sécrétion de facteurs néfastes, que dans les conditions utilisées, la sécrétion d'IGF-II soit inexistante ou insuffisante et finalement que le devis expérimental comporte des lacunes ou des facteurs confondants importants.

L'utilisation de cellules canaliculaires s'est révélée utile dans certains cas pour améliorer la survie et la fonction d'îlots de Langerhans. Cependant, il est connu que ces cellules peuvent sécréter des facteurs ayant des effets positifs ou négatifs sur les cellules environnantes. Également, des études comparatives de ces effets n'ont jamais été conduites à ce jour. De cette façon, les effets positifs de l'IGF-II, ou même du VEGF et IL-8, pourraient être contrecarrés par des cytokines néfastes sécrétées par les mêmes cellules stimulées.

De plus, la production de ces cytokines par les cellules canaliculaires pourrait expliquer les résultats *in vivo* obtenus. En fait, il semblerait que la présence de ces cellules avec des îlots encapsulés retardent la normalisation de la glycémie de souris diabétiques. Comme vu au jour 2 post-transplantation, aucune souris n'est normoglycémique (n=7) contrairement au groupe contrôle (n=5) où 100% le sont. De cette façon, la production de cytokines immédiatement après la transplantation pourrait influencer la fonction des îlots et ainsi retarder leur action.

De plus, la diminution de cette production pourrait expliquer l'augmentation de souris normoglycémiques dans les jours suivants.

Par exemple, Vosters *et al.* ont démontré que les cellules canaliculaires humaines présentaient la molécule CD40, membre de la famille du récepteur du *tumor necrosis factor* (TNF), capable d'activer le facteur de transcription NFκB et la production de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, ce mécanisme d'action ne survient que lorsque CD40 se lie à son ligand (CD154) présent sur les lymphocytes T [282]. Ces effets, qui ont été observés avec des greffons non-encapsulés; n'interviennent pas lorsqu'on utilise les microcapsules qui empêchent cette interaction. D'autre part, il est connu que les cellules canaliculaires peuvent induire la production d'oxyde nitrique (NO) suite à leur exposition à certaines cytokines (IL-1β et IFN-γ) [258]. Il a été découvert que leurs effets finaux dépendaient de la présence combinée de cytokines et de leurs concentrations [276]. Il a été prouvé que les cellules canaliculaires sécrètent également le facteur tissulaire (TF), qui est responsable de l'activation de la coagulation, en réponse à la réaction inflammatoire instantanée médiée par le sang (IBMIR). Ceci expliquerait en partie les réactions fibrotiques et inflammatoires post-transplantation [259, 283, 284] et reste un facteur important à considérer pour de futures implantations chez des souris immunocompétentes. En réponse à cette découverte, différents groupes utilisèrent une approche thérapeutique afin d'inhiber le facteur de faible poids moléculaire VIIa [283, 284]. Cependant, cette alternative devra être revisitée en raison de dangers potentiels à inhiber la voie de coagulation à long terme.

Les études de Gatto *et al.* ont permis d'identifier certaines cytokines sécrétées par les cellules canaliculaires fraîchement isolées [254]. Celles-ci peuvent produire les interleukines IL-1β, IL-6, IL-8, ainsi que du TNF-α, VEGF, IFN-γ et MCP-1. Cependant, leurs effets respectifs sur la survie et fonction d'îlots pancréatiques sont différents. Il est connu que l'IL-1β et IL-6 altèrent la sécrétion d'insuline et le métabolisme du glucose chez des îlots de rats *in vitro* [285] tout

comme la combinaison de ces deux interleukines jointes au facteur TNF- α [286]. Ce dernier, ainsi que l'IFN- γ , peuvent endommager l'ADN des îlots [287] et sont capables de potentialiser les effets de l'IL-1 β chez des îlots de souris par la génération de NO [288]. Ces résultats ont même déjà été observés chez des îlots humains [289].

Plusieurs études, telles que discutées plus haut, soutenaient notre hypothèse et les présents résultats obtenus étaient inattendus. Une explication plausible serait que l'hypothèse de départ soit erronée. En fait, il se pourrait que les bienfaits de ces cellules soient annulés par leur sécrétion de facteurs néfastes, que dans les conditions utilisées, la sécrétion d'IGF-II soit inexistante ou insuffisante et finalement que le devis expérimental comporte des lacunes ou des facteurs confondants importants; comme l'utilisation de baryum pour la gélification des capsules. Ainsi, il se pourrait que la sécrétion de ces nombreux facteurs soit différente dépendamment du type de cellules canaliculaires utilisées (cysts ou cellules isolées), de la méthode de purification des cellules (cellules de basse ou haute densité [254]), du modèle expérimental (*in vitro* vs *in vivo*) et même de la température de culture.

F. Conclusion et perspectives

La transplantation d'îlots encapsulés est une avenue intéressante et fort prometteuse pour la guérison du diabète de type 1. Cependant, différents paramètres doivent encore être optimisés afin d'obtenir le meilleur système possible. En fait, la viabilité des îlots représente un des problèmes majeurs de l'encapsulation et sa diminution marquée interfère grandement avec leurs réussites *in vivo*. La présente étude rapporte l'investigation de deux aspects importants influençant la survie des îlots de Langerhans isolés. La première étude analyse les effets de la purification de l'alginate, un biomatériau largement utilisé dans le domaine; tandis que la deuxième investigate la co-encapsulation d'un type cellulaire pancréatique : les cellules canaliculaires. Celles-ci sont connues pour être lié au pancréas lors de sa morphogénèse et pourrait permettre l'amélioration de la survie des îlots par la sécrétion de facteurs trophiques.

La perte du transplant, par la diminution de sa viabilité, était encore à ce jour imputée aux différentes réactions immunitaires survenant chez l'hôte. Celles-ci, par la fibrose péricapsulaire, empêchaient l'entrée des nutriments et oxygène ainsi que la sortie des déchets métaboliques. Ces réactions influençaient donc inévitablement la survie du transplant. Cependant, la première étude présentée démontre clairement que les contaminants présents dans l'alginate n'affectent pas seulement l'hôte mais également le greffon. En fait, nous avons démontré que leurs actions directes sur les îlots encapsulés diminuaient significativement leur survie et fonction *in vitro*. À l'avenir, les expériences *in vivo* ne pourront pas servir exclusivement à déterminer si un biomatériau est biocompatible et son développement devra maintenant inclure des expériences *in vitro* de survie et fonction du transplant. De prochaines études pourraient investiguer l'identité des protéines présentes dans l'alginate et déterminer si certaines sont importantes pour la survie des îlots et si leur extraction peut être évitée. De plus, l'alginate peut servir dans de nombreux domaines où certains de ces contaminants peuvent être

utiles. Par exemple, il a été démontré que les endotoxines sont utiles lors de thérapie artificielle utilisant la fièvre et améliore, de façon non-spécifique, l'efficacité du système immunitaire [290]. Ainsi, l'utilisation de microcapsules contenant des endotoxines en combinaison avec un système de livraison de médicament pourrait améliorer la réponse immunitaire et ainsi favoriser une meilleure action thérapeutique.

La deuxième étude a permis de démontrer que l'utilisation de cellules canaliculaires avec des îlots microencapsulés n'était peut-être pas le système le plus adéquat pour améliorer la survie et fonction des îlots; contrairement aux études antérieures démontrant de leur efficacité. En fait, on peut conclure que l'utilisation de ces cellules en coculture est efficace contrairement à leur co-encapsulation. D'autres études devront être conduites afin de maximiser les différents paramètres d'utilisation de ces cellules et de garantir un effet positif maximal. En fait, il serait intéressant d'analyser la sécrétion exacte d'IGF-II de notre culture de cellules canaliculaires et d'ainsi évaluer si ce facteur est en cause. L'utilisation d'un sécrétagogue pourrait être utilisée afin de remédier à une sécrétion potentiellement trop faible pour induire les effets positifs remarqués dans les expériences ultérieures. De plus, des études plus approfondies sur les différentes cytokines sécrétées par les cellules devraient être menées afin de mieux comprendre le contexte de leur sécrétion et d'empêcher la production de celles qui sont néfastes. Des études concluantes sur la production du facteur de croissance neuronale (*nerve growth factor*, NGF) pourraient également être conduites compte tenu qu'il est également sécrété par les cellules canaliculaires; quoique en quantité minime [232]. En fait, ce facteur est connu pour améliorer la survie d'îlots de souris non-encapsulés *in vitro* [245], influencer leur sécrétion d'insuline [243, 244] et pour prolonger la normoglycémie *in vivo* d'un modèle murin diabétique [246].

Donc, il est nécessaire de poursuivre plus loin les études favorisant une survie améliorée de l'îlot encapsulé afin de permettre une restauration maximisée de la glycémie.

G. Sources bibliographiques

1. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. Lancet, 2005. **365**(9467): p. 1333-46.
2. OMS, *Le diabète en quelques chiffres*. 2009.
3. Diabète Québec, *Le diabète de type 2*. 2009.
4. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2006. **29 Suppl 1**: p. S43-8.
5. Canada, P.H.A.o., *Diabetes in Canada: Highlights from the National Diabetes Surveillance System*. 2004-2005.
6. Shapiro, A.M., *Transplanting islets for diabetes: How to overcome the remaining hurdles in cell survival, supply and immune rejection*, in *The scientist*. 2006. p. 43-48.
7. Olefsky, J.M., *Prospects for research in diabetes mellitus*. Jama, 2001. **285**(5): p. 628-32.
8. Ohinmaa, A., et al., *The projection of prevalence and cost of diabetes in Canada:2000-2016*. Canadian J. of Diabetes, 2004. **28**(2): p. 1-8.
9. Gillespie, K.M., *Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention*. Cmaj, 2006. **175**(2): p. 165-70.
10. Bach, J.F., *Insulin-dependent diabetes mellitus as a beta-cell targeted disease of immunoregulation*. J Autoimmun, 1995. **8**(4): p. 439-63.
11. Notkins, A.L., *Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes*. J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 43545-8.
12. Green, E.A. and R.A. Flavell, *The initiation of autoimmune diabetes*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(6): p. 663-9.

13. Kukreja, A. and N.K. Maclaren, *Autoimmunity and diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(12): p. 4371-8.
14. Foulis, A.K., M. McGill, and M.A. Farquharson, *Insulitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man--macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells*. J Pathol, 1991. **165**(2): p. 97-103.
15. Goldsby, R., T. Kindt, and B. Osborne, *Immunologie: Le cours de Janis Kuby*. DUNOD ed. 2003, Paris: Sciences SUP. 660.
16. Eizirik, D.L., et al., *Use of a systems biology approach to understand pancreatic beta-cell death in Type 1 diabetes*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 3): p. 321-7.
17. Eizirik, D.L. and T. Mandrup-Poulsen, *A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis*. Diabetologia, 2001. **44**(12): p. 2115-33.
18. Cnop, M., et al., *Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities*. Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S97-107.
19. Yoon, J.W., H.S. Jun, and P. Santamaria, *Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells*. Autoimmunity, 1998. **27**(2): p. 109-22.
20. Potter, K.N. and T.J. Wilkin, *The molecular specificity of insulin autoantibodies*. Diabetes Metab Res Rev, 2000. **16**(5): p. 338-53.
21. Chen, M.C., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 is expressed in pancreatic islets from prediabetic NOD mice and in interleukin-1 beta-exposed human and rat islet cells*. Diabetologia, 2001. **44**(3): p. 325-32.
22. Cardozo, A.K., et al., *IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice*. Diabetologia, 2003. **46**(2): p. 255-66.

23. Wang, X., et al., *Identification of a molecular signature in human type 1 diabetes mellitus using serum and functional genomics*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1929-37.
24. Eizirik, D.L., et al., *Use of microarray analysis to unveil transcription factor and gene networks contributing to Beta cell dysfunction and apoptosis*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1005**: p. 55-74.
25. Appels, B., et al., *Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells*. The Journal of Immunology, 1989. **142**: p. 3803-3808.
26. Mandrup-Poulsen, T., et al., *Human tumor necrosis factor potentiates human interleukin 1-mediated rat pancreatic beta-cell cytotoxicity*. J Immunol, 1987. **139**(12): p. 4077-82.
27. Hill, D.J., et al., *Insulin-like growth factors prevent cytokine-mediated cell death in isolated islets of Langerhans from pre-diabetic non-obese diabetic mice*. J Endocrinol, 1999. **161**(1): p. 153-65.
28. Liadis, N., et al., *Caspase-3-dependent beta-cell apoptosis in the initiation of autoimmune diabetes mellitus*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(9): p. 3620-9.
29. Szkudelski, T., *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*. Physiol Res, 2001. **50**(6): p. 537-46.
30. Tattersall, R.B. and D.A. Pyke, *Diabetes in identical twins*. Lancet, 1972. **2**(7787): p. 1120-5.
31. Visalli, N., et al., *Environmental risk factors for type 1 diabetes in Rome and province*. Arch Dis Child, 2003. **88**(8): p. 695-8.
32. Couper, J.J., et al., *Lack of association between duration of breast-feeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity*. Diabetes, 1999. **48**(11): p. 2145-9.

33. Carlsson, B. and L. Hanson, *Immunologic effects of breast-feeding in the infant*, in *Handbook of Mucosal Immunology*, O. PL, et al., Editors. 1994, Academic: San Diego, CA. p. 653-660.
34. Xanthou, M., J. Bines, and W.A. Walker, *Human milk and intestinal host defense in newborns: an update*. *Adv Pediatr*, 1995. **42**: p. 171-208.
35. Srivastava, M.D., et al., *Cytokines in human milk*. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1996. **93**(3): p. 263-87.
36. Harrison, L.C. and M.C. Honeyman, *Cow's milk and type 1 diabetes: the real debate is about mucosal immune function*. *Diabetes*, 1999. **48**(8): p. 1501-7.
37. Vaarala, O., et al., *Cow milk feeding induces antibodies to insulin in children--a link between cow milk and insulin-dependent diabetes mellitus?* *Scand J Immunol*, 1998. **47**(2): p. 131-5.
38. Fohlman, J. and G. Friman, *Is juvenile diabetes a viral disease?* *Ann Med*, 1993. **25**(6): p. 569-74.
39. Honeyman, M.C., et al., *Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2000. **49**(8): p. 1319-24.
40. Sadeharju, K., et al., *Enterovirus infections as a risk factor for type I diabetes: virus analyses in a dietary intervention trial*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **132**(2): p. 271-7.
41. Yoon, J.W., et al., *Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis*. *N Engl J Med*, 1979. **300**(21): p. 1173-9.
42. Horwitz, M.S., et al., *Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry*. *Nat Med*, 1998. **4**(7): p. 781-5.
43. Yoon, J.W., et al., *Virus-induced diabetes mellitus. XI. Replication of coxsackie B3 virus in human pancreatic beta cell cultures*. *Diabetes*, 1978. **27**(7): p. 778-81.

44. Prince, G.A., et al., *Infection of human pancreatic beta cell cultures with mumps virus*. Nature, 1978. **271**(5641): p. 158-61.
45. Yoon, J.W., et al., *Infection of cultured human pancreatic B cells with reovirus type 3*. Diabetologia, 1981. **20**(4): p. 462-7.
46. Honeyman, M.C., N.L. Stone, and L.C. Harrison, *T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents*. Mol Med, 1998. **4**(4): p. 231-9.
47. Yoon, J.W., et al., *Effects of environmental factors on the development of insulin-dependent diabetes mellitus*. Clin Invest Med, 1987. **10**(5): p. 457-69.
48. Miller, L.V., J.D. Stokes, and C. Silpipat, *Diabetes mellitus and autonomic dysfunction after vacor rodenticide ingestion*. Diabetes Care, 1978. **1**(2): p. 73-6.
49. Yoon, J.W., et al., *Antibody to islet cell antigens from patients with Vacor induced insulin-dependent diabetes mellitus*. Diabetes, 1984. **33**(Suppl.1): p. 161A.
50. Barratt, B.J., et al., *Remapping the insulin gene/IDDM2 locus in type 1 diabetes*. Diabetes, 2004. **53**(7): p. 1884-9.
51. Ueda, H., et al., *Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 506-11.
52. Bottini, N., et al., *A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes*. Nat Genet, 2004. **36**(4): p. 337-8.
53. Begovich, A.B., et al., *A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(2): p. 330-7.
54. Smyth, D., et al., *Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus*. Diabetes, 2004. **53**(11): p. 3020-3.

55. Vella, A., et al., *Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(5): p. 773-9.
56. Todd, J.A., et al., *Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 857-64.
57. Smyth, D.J., et al., *A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region*. Nat Genet, 2006. **38**(6): p. 617-9.
58. Hakonarson, H., et al., *A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 591-4.
59. Ounissi-Benkalha, H. and C. Polychronakos, *The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms*. Trends Mol Med, 2008. **14**(6): p. 268-75.
60. Maier, L.M. and L.S. Wicker, *Genetic susceptibility to type 1 diabetes*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(6): p. 601-8.
61. Michaliszyn, S.F., et al., *Physical fitness, dietary intake, and metabolic control in adolescents with type 1 diabetes*. Pediatr Diabetes, 2009.
62. Deedwania, P.C. and V.A. Fonseca, *Diabetes, prediabetes, and cardiovascular risk: shifting the paradigm*. Am J Med, 2005. **118**(9): p. 939-47.
63. Association, C.D., *Types of insulin (approved for use in Canada)*. 2009.
64. Kelly, W.D., et al., *Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy*. Surgery, 1967. **61**(6): p. 827-37.
65. Gruessner, A.C. and D.E. Sutherland, *Analysis of United States (US) and non-US pancreas transplants as reported to the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) and to the United Network for Organ Sharing (UNOS)*. Clin Transpl, 1998: p. 53-73.

66. Gruessner, R.W., et al., *The surgical risk of pancreas transplantation in the cyclosporine era: an overview*. J Am Coll Surg, 1997. **185**(2): p. 128-44.
67. Beck, J., et al., *Islet encapsulation: strategies to enhance islet cell functions*. Tissue Eng, 2007. **13**(3): p. 589-99.
68. Ballinger, W.F. and P.E. Lacy, *Transplantation of intact pancreatic islets in rats*. Surgery, 1972. **72**: p. 175-186.
69. Scharp, D.W., et al., *Insulin independence after islet transplantation into Type I diabetic patient*. Diabetes, 1990. **39**: p. 515-518.
70. Manske, C.L., Y. Wang, and W. Thomas, *Mortality of cadaveric kidney transplantation versus combined kidney-pancreas transplantation in diabetic patients*. Lancet, 1995. **346**(8991-8992): p. 1658-62.
71. Shapiro, A.M., et al., *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*. N Engl J Med, 2000. **343**(4): p. 230-8.
72. Ryan, E.A., et al., *Five-year follow-up after clinical islet transplantation*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2060-9.
73. Shapiro, A.M., et al., *International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation*. N Engl J Med, 2006. **355**(13): p. 1318-30.
74. Bennet, W., et al., *Incompatibility between human blood and isolated islets of langerhans*. Diabetes, 1999. **48**: p. 1907-1914.
75. Robertson, R.P., et al., *Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes*. Diabetes Care, 2000. **23**: p. 112-116.
76. Rela, M. and A. Dhawan, *Liver transplantation in children*. Indian J Pediatr, 2002. **69**(2): p. 175-83.
77. Bisceglie, V., *Über die antineoplastische Immunität*. Krebsforsch, 1933. **40**: p. 141-158.

78. Algire, G.H., *An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse*. J Natl Cancer Inst, 1943. **4**: p. 1-11.
79. Chang, T.M.S., *Semipermeable microcapsules*. Science, 1964. **146**: p. 524-526.
80. Lim, F. and A.M. Sun, *Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas*. Science, 1980. **210**(4472): p. 908-10.
81. Mikos, A.G., et al., *Mini-review: Islet transplantation to create a bioartificial pancreas*. Biotechnol Bioeng, 1994. **43**(7): p. 673-7.
82. Knazek, R.A., et al., *Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro*. Science, 1972. **178**(56): p. 65-6.
83. Chick, W.L., A.A. Like, and V. Lauris, *Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas*. Science, 1975. **187**(4179): p. 847-9.
84. Sun, A.M., et al., *The Use, in Diabetic rats and monkeys, of artificial capillary units containing cultured Islets of Langerhans (Artificial Endocrine Pancreas)*. Diabetes, 1977. **26**: p. 12.
85. Maki, T., et al., *Treatment of severe diabetes mellitus for more than one year using a vascularized hybrid artificial pancreas*. Transplantation, 1993. **55**: p. 713-718.
86. de Haan, B., et al., *Experimental approaches for transplantation of islets in the absence of immunosuppression*, in *Trends in diabetes mellitus research*, A.M. Ford, Editor. 2005, Nove Science. p. 143-173.
87. Lanza, R.P., A.M. Beyer, and W.L. Chick, *Xenogenic humoral responses to islets transplanted in biohybrid diffusion chambers*. Transplantation, 1994. **57**(9): p. 1371-5.
88. Loudovaris, T., et al., *Correction of diabetic nod mice with insulinomas implanted within Baxter immunoisolation devices*. J Mol Med, 1999. **77**(1): p. 219-22.

89. Jain, K., et al., *Glucose control and long-term survival in biobreeding/Worcester rats after intraperitoneal implantation of hydrophilic macrobeads containing porcine islets without immunosuppression*. Transplantation, 1999. **68**(11): p. 1693-700.
90. Lacy, P.E., et al., *Maintenance of normoglycemia in diabetic mice by subcutaneous xenografts of encapsulated islets*. Science, 1991. **254**: p. 1782-1784.
91. Juang, J.H., et al., *Outcome of subcutaneous islet transplantation improved by polymer device*. Transplantation, 1996. **61**(11): p. 1557-61.
92. Tatarkiewicz, K., et al., *Reversal of hyperglycemia in mice after subcutaneous transplantation of macroencapsulated islets*. Transplantation, 1999. **67**(5): p. 665-71.
93. Siebers, U., et al., *Histocompatibility of semipermeable membranes for implantable diffusion devices (Bioartificial pancreas)*. Transplantation Proceedings, 1990. **22**: p. 834-835.
94. Woodward, S.C., *How fibroblasts and giant cells encapsulate implants: considerations in design of glucose sensors*. Diabetes Care, 1982. **5**: p. 278-281.
95. Horcher, A., et al., *Insulin release from different models of a bioartificial pancreas (microencapsulation versus alginate-coating)*. Transplantation Proceedings, 1992. **24**: p. 2950-2951.
96. Soon-Shiong, P., et al., *Glucose-insulin kinetics of the extravascular bioartificial pancreas. A study using microencapsulated rat islets*. Asaio J, 1992. **38**(4): p. 851-4.
97. Lum, Z.P., et al., *Prolonged reversal of diabetic state in NOD mice by xenografts of microencapsulated rat islets*. Diabetes, 1991. **40**(11): p. 1511-6.
98. De Vos, P. and R. Van Schilfgaarde, *Biocompatibility issues*, in *Cell encapsulation technology and therapeutics*, W.M. Kuhlreiber, R.P. Lanza, and W.L. Chick, Editors. 1999, Birkhauser: Boston. p. 63-75.

99. Lum, Z.P., et al., *Xenografts of rat islets into diabetic mice. An evaluation of new smaller capsules*. Transplantation, 1992. **53**(6): p. 1180-3.
100. Sun, A.M., et al., *In vitro and in vivo evaluation of microencapsulated porcine islets*. Asaio J, 1992. **38**(2): p. 125-7.
101. Soon-Shiong, P., et al., *Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5843-7.
102. De Vos, P., et al., *Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts*. Transplantation, 1996. **62**(7): p. 893-9.
103. De Vos, P., et al., *Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets*. Diabetologia, 1997. **40**(3): p. 262-70.
104. Cui, H., et al., *Long-term metabolic control of autoimmune diabetes in spontaneously diabetic nonobese diabetic mice by nonvascularized microencapsulated adult porcine islets*. Transplantation, 2009. **88**(2): p. 160-9.
105. Korbitt, G.S., et al., *Improved survival of microencapsulated islets during in vitro culture and enhanced metabolic function following transplantation*. Diabetologia, 2004. **47**(10): p. 1810-8.
106. Iwata, H., et al., *Evaluation of microencapsulated islets in agarose gel as bioartificial pancreas by studies of hormone secretion in culture and by xenotransplantation*. Diabetes, 1989. **38 Suppl 1**: p. 224-5.
107. Cruise, G.M., et al., *In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate membranes*. Cell Transplant, 1999. **8**(3): p. 293-306.
108. Dawson, R.M., et al., *Microencapsulation of CHO cells in a hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate copolymer*. Biomaterials, 1987. **8**(5): p. 360-6.

109. de Vos, P., A.F. Hamel, and K. Tatarkiewicz, *Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets*. Diabetologia, 2002. **45**(2): p. 159-73.
110. Guiseley, K.B., *Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization*. Enzyme Microb Technol, 1989. **11**: p. 706-715.
111. Sandford, P.A., *High purity chitosan and alginate: preparation, analysis and applications*. Front Carb Res, 1992. **2**: p. 250-269.
112. McDowell, R. *Properties of alginates*. in *Kelco international (5th edition)*. 1986. London.
113. Otterlei, M., et al., *Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate*. J Immunother, 1991. **10**(4): p. 286-91.
114. Clayton, H.A., et al., *The effect of capsule composition on the biocompatibility of alginate-poly-L-lysine capsules*. J Microencapsul, 1991. **8**(2): p. 221-33.
115. Zimmermann, U., et al., *Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis*. Electrophoresis, 1992. **13**(5): p. 269-74.
116. Pueyo, M.E., et al., *In vitro activation of human macrophages by alginate-polylysine microcapsules*. J Biomater Sci Polym Ed, 1993. **5**(3): p. 197-203.
117. De Vos, P., B. De Haan, and R. Van Schilfgaarde, *Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules*. Biomaterials, 1997. **18**(3): p. 273-8.
118. Clayton, H.A., et al., *A study of the effect of capsule composition on the viability of cultured alginate/poly-L-lysine--encapsulated rat islets*. Diabetes Res, 1990. **14**(3): p. 127-32.
119. Fujihara, M. and T. Nagumo, *An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophages and the antitumor activity*. Carbohydrate Research, 1993. **243**: p. 211-216.

120. Klock, G., et al., *Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates*. Biomaterials, 1997. **18**: p. 707-713.
121. Dusseault, J. and J.P. Halle, *Alginate hydrogels for cell microencapsulation and immunoprotection*, in *Recent advances in biomaterials research*, J. Hu, Editor. 2008, Transworld Research Network: Kerala. p. 23-42.
122. Morch, Y.A., B.L. Strand, and G. Skjak-Baek, *Alginate structure function relationships relevant to their use for cell encapsulation*, in *The bioartificial pancreas and other biohybrid therapies*, J.P. Halle, P. de Vos, and L. Rosenberg, Editors. 2009, Transworld Research Signpost: Kerala.
123. De Vos, P., B.J. De Haan, and R. Van Schilfgaarde, *Upscaling the production of microencapsulated pancreatic islets*. Biomaterials, 1997. **18**(16): p. 1085-90.
124. Serp, D., et al., *Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization*. Biotechnol Bioeng, 2000. **70**(1): p. 41-53.
125. Brunetti, P., et al., *A simulation study on a self-tuning portable controller of blood glucose*. The International Journal of Artificial Organs, 1993. **16**: p. 51-57.
126. O'Shea, G.M., M.F. Goosen, and A.M. Sun, *Prolonged survival of transplanted islets of Langerhans encapsulated in a biocompatible membrane*. Biochim Biophys Acta, 1984. **804**(1): p. 133-6.
127. Strand, B.L., et al., *Poly-L-Lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines*. Cell Transplant, 2001. **10**(3): p. 263-75.
128. de Vos, P., C.G. Hoogmoed, and H.J. Busscher, *Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells*. J Biomed Mater Res, 2002. **60**(2): p. 252-9.
129. Tam, S.K., J.P. Halle, and L. Yahia, *La microencapsulation pour la thérapie cellulaire*, in *Microencapsulation: des sciences aux techniques*, T. Vandamme, D. Poncelet, and P. Subra-Pasternault, Editors. 2007, Lavoisier: Paris.

130. Fritschy, W.M., et al., *The efficacy of intraperitoneal pancreatic islet isografts in the reversal of diabetes in rats*. Transplantation, 1991. **52**: p. 777-783.
131. Hall, J.C., et al., *The pathobiology of peritonitis*. Gastroenterology, 1998. **114**(1): p. 185-96.
132. Bakeine, G.J., et al., *Surface properties and implantation site affect the capsular fibrotic overgrowth*. J Biomed Mater Res A, 2007. **83**(4): p. 965-9.
133. Sutherland, D.E.R., et al., *Islet transplantation: An update*. Diabetes/Metabolism Reviews, 1996. **12**: p. 137-150.
134. Ryan, E.A., et al., *Risks and side effects of islet transplantation*. Curr Diab Rep, 2004. **4**(4): p. 304-9.
135. Toso, C., et al., *Effect of microcapsule composition and short-term immunosuppression on intraportal biocompatibility*. Cell Transplant, 2005. **14**(2-3): p. 159-67.
136. Scharp, D.W., et al., *The effect of transplantation site and islet mass on long-term survival and metabolic and hormonal function of canine purified islet autografts*. Cell Transplantation, 1992. **1**: p. 245-254.
137. Weir, G.C. and S. Bonner-Weir, *Scientific and political impediments to successful islet transplantation*. Diabetes, 1997. **46**: p. 1247-1256.
138. Nelson, L., et al., *Comparison of various sites of islet autotransplantation in the canine model*. Transplantation Proceedings, 1997. **29**: p. 2095.
139. Brendel, M., et al., *International islet transplant registry report*. University of Giessen, 1999: p. 1-20.
140. Lacy, P.E., J.M. Davie, and E.H. Finke, *Prolongation of islet xenograft survival (rat to mouse)*. Diabetes, 1981. **30**: p. 285-291.

141. Reece-Smith, H., et al., *Indefinite survival of isolated pancreatic islets in rats rendered immunologically unresponsive to renal allografts*. Transplantation, 1982. **33**(4): p. 452-3.
142. Jansson, L. and C. Hellerstrom, *Stimulation by glucose of the blood flow to the pancreatic islets of the rat*. Diabetologia, 1983. **25**(1): p. 45-50.
143. Ar'Rajab, A., R. Sundberg, and B. Ahren, *The functional effects of a colloid in liver cold storage preservation*. Transplant Proc, 1990. **22**(5): p. 2191-3.
144. Yang, Z., et al., *Survival of pancreatic islet xenografts in NOD mice with the theracyte device*. Transplant Proc, 2002. **34**(8): p. 3349-50.
145. Wang, W., et al., *Reversal of diabetes in mice by xenotransplantation of a bioartificial pancreas in a prevascularized subcutaneous site*. Transplantation, 2002. **73**(1): p. 122-9.
146. Fritschy, W.M., et al., *The capsular overgrowth on microencapsulated pancreatic islet grafts in streptozotocin and autoimmune diabetic rats*. Transpl Int, 1994. **7**(4): p. 264-71.
147. Cotton, C.K., *Engineering challenges in cell-encapsulation technology*. Trends Biotechnol, 1996. **14**(5): p. 158-62.
148. King, A., et al., *The effect of capsule composition in the reversal of hyperglycemia in diabetic mice transplanted with microencapsulated allogeneic islets*. Diabetes Technol Ther, 2003. **5**(4): p. 653-63.
149. Espevik, T., et al., *The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers*. Eur J Immunol, 1993. **23**(1): p. 255-61.
150. Otterlei, M., et al., *Similar mechanisms of action of defined polysaccharides and lipopolysaccharides: characterization of binding and tumor necrosis factor alpha induction*. Infect Immun, 1993. **61**(5): p. 1917-25.
151. Jahr, T.G., et al., *Induction of tumor necrosis factor production from monocytes stimulated with mannuronic acid polymers and involvement of lipopolysaccharide-*

- binding protein, CD14, and bactericidal/permeability-increasing factor.* Infect Immun, 1997. **65**(1): p. 89-94.
152. Robitaille, R., et al., *Inflammatory response to peritoneal implantation of alginate-poly-L-lysine microcapsules.* Biomaterials, 2005. **26**(19): p. 4119-27.
 153. De Vos, P., et al., *Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth?* Diabetes, 1999. **48**(7): p. 1381-8.
 154. Zimmermann, U., et al., *Biocompatible encapsulation materials: Fundamentals and application*, in *Cell encapsulation technology and therapeutics*, W.M. Kuhtreiber, R.P. Lanza, and W.L. Chick, Editors. 1999, Birkhauser: Boston. p. 40-52.
 155. Magalhaes, P.O., et al., *Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review.* J Pharm Pharm Sci, 2007. **10**(3): p. 388-404.
 156. Vargas, F., et al., *Endotoxin activity of collagenase and human islet transplantation.* Lancet, 1997. **350**(9078): p. 641.
 157. Vargas, F., et al., *Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation.* Transplantation, 1998. **65**(5): p. 722-7.
 158. Brandhorst, H., et al., *Monitoring of insulin content during human islet isolation.* Transplantation Proceedings, 1998. **30**: p. 364-365.
 159. Jahr, H., et al., *Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll.* J. Mol. Med., 1999. **77**(1): p. 118-120.
 160. Kanagaraja, S., et al., *Surface characterization, protein adsorption, and initial cell-surface reactions on glutathione and 3-mercapto-1,2-propanediol immobilized to gold.* J Biomed Mater Res, 1999. **46**(4): p. 582-91.
 161. Godek, M.L., et al., *Morphology and growth of murine cell lines on model biomaterials.* Biomed Sci Instrum, 2004. **40**: p. 7-12.

162. Ménard, M., et al., *Role of protein contaminants in the immunogenicity of alginates*. Accepted in JBMR: Part B, 2009.
163. Wandrey, C. and D.S. Vidal, *Purification of polymeric biomaterials*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **944**: p. 187-98.
164. Zimmermann, U., et al., *A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **944**: p. 199-215.
165. Klock, G., et al., *Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation*. Appl Microbiol Biotechnol, 1994. **40**(5): p. 638-43.
166. Prokop, A. and T.G. Wang, *Purification of polymers used for fabrication of an immunoisolation barrier*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **831**: p. 223-31.
167. Tam, S.K., et al., *Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation*. Biomaterials, 2006. **27**(8): p. 1296-305.
168. Dusseault, J., et al., *Evaluation of alginate purification methods: Effect on polyphenol, endotoxin, and protein contamination*. J Biomed Mater Res A, 2006. **76**(2): p. 243-51.
169. Kyriakis, J.M., et al., *The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases*. Nature, 1994. **369**(6476): p. 156-60.
170. Kummer, J.L., P.K. Rao, and K.A. Heidenreich, *Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20490-4.
171. Aikin, R., D. Maysinger, and L. Rosenberg, *Cross-talk between phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and c-jun NH2-terminal kinase mediates survival of isolated human islets*. Endocrinology, 2004. **145**(10): p. 4522-31.

172. Aikin, R., et al., *Inhibition of caspase-mediated PARP-1 cleavage results in increased necrosis in isolated islets of Langerhans*. J Mol Med, 2004. **82**(6): p. 389-97.
173. Paraskevas, S., et al., *Modulation of JNK and p38 stress activated protein kinases in isolated islets of Langerhans: insulin as an autocrine survival signal*. Ann Surg, 2001. **233**(1): p. 124-33.
174. Paraskevas, S., et al., *Activation and expression of ERK, JNK, and p38 MAP-kinases in isolated islets of Langerhans: implications for cultured islet survival*. FEBS Lett, 1999. **455**(3): p. 203-8.
175. Paraskevas, S., et al., *Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis*. Pancreas, 2000. **20**(3): p. 270-6.
176. Van Deijnen, J.H., et al., *Distribution of collagens type I, type III and type V in the pancreas of rat, dog, pig and man*. Cell Tissue Res, 1994. **277**(1): p. 115-21.
177. Hughes, S.J., et al., *Comparison of the collagen VI content within the islet-exocrine interface of the head, body, and tail regions of the human pancreas*. Transplant Proc, 2005. **37**(8): p. 3444-5.
178. Sorenson, R., *Isolation of an insulin secretion granule-rich fraction from rat islets*. Anatomical Record, 1968. **160**: p. 498.
179. Lacy, P.E. and M. Kostianovsky, *Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas*. Diabetes, 1967. **16**(1): p. 35-9.
180. Wang, R.N., S. Paraskevas, and L. Rosenberg, *Characterization of integrin expression in islets isolated from hamster, canine, porcine and human pancreas*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1999. **47**: p. 499-506.
181. Navarro-Alvarez, N., et al., *Reestablishment of microenvironment is necessary to maintain in vitro and in vivo human islet function*. Cell Transplant, 2008. **17**(1-2): p. 111-9.

182. Lucas-Clerc, C., et al., *Long-term culture of human pancreatic islets in an extracellular matrix : morphological and metabolic effects*. Molecular and Cellular Endocrinology, 1993. **94**: p. 9-20.
183. Frisch, S.M. and H. Francis, *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis*. J Cell Biol, 1994. **124**(4): p. 619-26.
184. Boudreau, N., et al., *Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix*. Science, 1995. **267**(5199): p. 891-3.
185. Rosenberg, L., et al., *Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death*. Surgery, 1999. **126**(2): p. 393-8.
186. Bosco, D., et al., *Importance of cell-matrix interactions in rat islets beta-cell secretion in vitro*. Diabetes, 2000. **49**: p. 233-243.
187. Hammar, E., et al., *Extracellular matrix protects pancreatic beta-cells against apoptosis: role of short- and long-term signaling pathways*. Diabetes, 2004. **53**(8): p. 2034-41.
188. Wang, R.N. and L. Rosenberg, *Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship*. J Endocrinol, 1999. **163**(2): p. 181-90.
189. Beattie, G.M., et al., *Functional impact of attachment and purification in the short term culture of human pancreatic islets*. J Clin Endocrinol Metab, 1991. **73**(1): p. 93-8.
190. Kaiser, N., et al., *Monolayer culture of adult rat pancreatic islets on extracellular matrix: long term maintenance of differentiated B-cell function*. Endocrinology, 1988. **123**(2): p. 834-40.
191. Kaiser, N., et al., *Monolayer culture of adult rat pancreatic islets on extracellular matrix: modulation of B-cell function by chronic exposure to high glucose*. Endocrinology, 1991. **129**(4): p. 2067-76.

192. Weber, L.M., et al., *The effects of cell-matrix interactions on encapsulated beta-cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides*. Biomaterials, 2007. **28**(19): p. 3004-11.
193. Weber, L.M., K.N. Hayda, and K.S. Anseth, *Cell-matrix interactions improve beta-cell survival and insulin secretion in three-dimensional culture*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(12): p. 1959-68.
194. Parr, E.L., K.M. Bowen, and K.J. Lafferty, *Cellular changes in cultured mouse thyroid glands and islets of Langerhans*. Transplantation, 1980. **30**: p. 135-141.
195. Mendola, J.F., et al., *Immunocytochemical study of pancreatic islet revascularization in islet isograft*. Transplantation, 1994. **57**: p. 725-730.
196. Li, C. and R.M. Jackson, *Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(2): p. C227-41.
197. Evans, J.L., et al., *Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?* Diabetes, 2003. **52**(1): p. 1-8.
198. Zekorn, T., et al., *Impact of the perfluorochemical FC43 on function of isolated islets: a preliminary report*. Horm Metab Res, 1991. **23**(6): p. 302-3.
199. Matsumoto, S., et al., *Extending the margin of safety of preservation period for resuscitation of ischemically damaged pancreas during preservation using the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) method at 20 degrees C with thromboxane A2 synthesis inhibitor OKY046*. Transplantation, 1996. **62**(7): p. 879-83.
200. Halban, P.A., et al., *Spontaneous reassociation of dispersed adult rat pancreatic islet cells into aggregates with three-dimensional architecture typical of native islets*. Diabetes, 1987. **36**: p. 783-790.
201. Lehmann, R., et al., *Superiority of small islets in human islet transplantation*. Diabetes, 2007. **56**(3): p. 594-603.

202. MacGregor, R.R., et al., *Small rat islets are superior to large islets in in vitro function and in transplantation outcomes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(5): p. E771-9.
203. Wright, J.R., H. Yang, and K.C. Dooley, *Tilapia-A source of hypoxia-resistant islet cells for encapsulation*. Cell Transplantation, 1998. **7**: p. 299-307.
204. Wright, J.R., Jr. and B. Pohajdak, *Cell therapy for diabetes using piscine islet tissue*. Cell Transplant, 2001. **10**(2): p. 125-43.
205. Selawry, H.P. and K. Whittington, *Extended allograft survival of islets grafted into intra-abdominally placed testis*. Diabetes, 1984. **33**(4): p. 405-6.
206. Selawry, H.P. and D.F. Cameron, *Sertoli cell-enriched fractions in successful islet cell transplantation*. Cell Transplant, 1993. **2**(2): p. 123-9.
207. McClure, R.F., C.J. Heppelmann, and C.V. Paya, *Constitutive Fas ligand gene transcription in Sertoli cells is regulated by Sp1*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7756-62.
208. Owen-Schaub, L.B., et al., *DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement*. Cell Immunol, 1992. **140**(1): p. 197-205.
209. Nagata, S. and P. Golstein, *The Fas death factor*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1449-56.
210. Korbitt, G.S., J.F. Elliot, and R.V. Rajotte, *Cotransplantation of allogenic islets with allogenic testicular cell aggregates allows long-term graft survival without systemic immunosuppression*. Diabetes, 1997. **46**: p. 317-322.
211. Luca, G., et al., *Improved function of rat islets upon co-microencapsulation with Sertoli's cells in alginate/poly-L-ornithine*. AAPS PharmSciTech, 2001. **2**(3): p. E15.
212. Calafiore, R., et al., *Cellular support systems for alginate microcapsules containing islets, as composite bioartificial pancreas*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **944**: p. 240-51.

213. Yang, H. and J.R. Wright, Jr., *Co-encapsulation of Sertoli enriched testicular cell fractions further prolongs fish-to-mouse islet xenograft survival*. Transplantation, 1999. **67**(6): p. 815-20.
214. Yang, H., A. Al-Jazaeri, and J.R. Wright, Jr., *The immunoprotective effect of Sertoli cells coencapsulated with islet xenografts is not dependent upon Fas ligand expression*. Cell Transplant, 2002. **11**(8): p. 799-801.
215. Hayek, A., et al., *Growth factor/matrix-induced proliferation of human adult B-cells*. Diabetes, 1995. **44**: p. 1458-1460.
216. Wiegand, F., K.-D. Kroncke, and V. Kolb-Bachofen, *Macrophage-generated nitric oxide as cytotoxic factor in destruction of alginate-encapsulated islets*. Transplantation, 1993. **56**: p. 1206-1212.
217. Gladwin, M.T., J.H. Crawford, and R.P. Patel, *The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(6): p. 707-17.
218. Chae, S.Y., S.W. Kim, and Y.H. Bae, *Effect of cross-linked hemoglobin on functionality and viability of microencapsulated pancreatic islets*. Tissue Eng, 2002. **8**(3): p. 379-94.
219. Chae, S.Y., et al., *Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin*. Biomaterials, 2004. **25**(5): p. 843-50.
220. Badylak, S.F., et al., *Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog*. J Surg Res, 1989. **47**(1): p. 74-80.
221. Sandusky, G.E., Jr., et al., *Histologic findings after in vivo placement of small intestine submucosal vascular grafts and saphenous vein grafts in the carotid artery in dogs*. Am J Pathol, 1992. **140**(2): p. 317-24.
222. Lakey, J.R., et al., *Improved islet survival and in vitro function using small intestinal submucosa*. Transplant Proc, 1998. **30**(2): p. 383.

223. Lakey, J.R., et al., *Improved islet survival and in vitro function using solubilized small intestinal submucosa*. Cell Tissue Bank, 2001. **2**(4): p. 217-24.
224. Tian, X.H., et al., *Effect of small intestinal submucosa on islet recovery and function in vitro culture*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005. **4**(4): p. 524-9.
225. Tian, X.H., et al., *Small intestinal submucosa improves islet survival and function during in vitro culture*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(46): p. 7378-83.
226. Xiaohui, T., et al., *Small intestinal submucosa improves islet survival and function in vitro culture*. Transplant Proc, 2006. **38**(5): p. 1552-8.
227. Githens, S., *Differentiation and development of the pancreas in animals*, in *The pancreas: biology, pathobiology and disease*, V.L. Go, et al., Editors. 1993, Raven Press: New York. p. 21-55.
228. Bouwens, L., *Cytokeratins and cell differentiation in the pancreas*. J Pathol, 1998. **184**(3): p. 234-9.
229. Case, R.M. and B.E. Argent, *Pancreatic duct cell secretion. Control and mechanisms of transport*, in *The pancreas: biology, pathobiology and disease*, V.L.W. Go, E.R. DiMagno, and J. Gardner, Editors. 1993, Raven Press: New York. p. 301-350.
230. Argent, B.E. and R.M. Case, *Pancreatic ducts: cellular mechanism and control of HCO₃⁻ secretion*, in *Physiology of the gastrointestinal tract*, L.R. Johnson, Editor. 1994, Raven Press: New York. p. 1473-1497.
231. Metrakos, P., et al., *Intercellular communication and maintenance of islet cell mass--implications for islet transplantation*. Surgery, 1993. **114**(2): p. 423-7; discussion 427-8.
232. Ilieva, A., et al., *Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas*. J Endocrinol, 1999. **161**(3): p. 357-64.
233. O'Dell, S.D. and I.N. Day, *Insulin-like growth factor II (IGF-II)*. Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(7): p. 767-71.

234. Zhang, Q., et al., *Insulin-like growth factor II signaling through the insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor promotes exocytosis in insulin-secreting cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6232-7.
235. Petrik, J., et al., *Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor*. Endocrinology, 1998. **139**(6): p. 2994-3004.
236. Petrik, J., et al., *Overexpression of insulin-like growth factor-II in transgenic mice is associated with pancreatic islet cell hyperplasia*. Endocrinology., 1999. **140**(5): p. 2353-2363.
237. Hill, D.J., et al., *Increased and persistent circulating insulin-like growth factor II in neonatal transgenic mice suppresses developmental apoptosis in the pancreatic islets*. Endocrinology, 2000. **141**(3): p. 1151-7.
238. Robitaille, R., et al., *IGF-II allows prolonged blood glucose normalization with a reduced islet cell mass transplantation*. Endocrinology, 2003. **144**(7): p. 3037-3045.
239. Movahedi, B., et al., *Pancreatic duct cells in human islet cell preparations are a source of angiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor*. Diabetes, 2008. **57**(8): p. 2128-36.
240. Sigrist, S., et al., *Influence of VEGF on the viability of encapsulated pancreatic rat islets after transplantation in diabetic mice*. Cell Transplant, 2003. **12**(6): p. 627-35.
241. Rosenbaum, T., et al., *Pancreatic beta cells synthesize and secrete nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7784-8.
242. Vidaltamayo, R., M. Sanchez-Soto, and T. Rosenbaum, *Neuron-like phenotypic changes in pancreatic beta cells induced by NGF, FGF and dbcAMP*. Endocrine, 1996. **4**: p. 19.
243. Hiriart, M., R. Vidaltamayo, and M.C. Sanchez-Soto, *Nerve and fibroblast growth factors as modulators of pancreatic beta cell plasticity and insulin secretion*. Isr Med Assoc J, 2001. **3**(2): p. 114-6.

244. Vidaltamayo, R., M.C. Sanchez-Soto, and M. Hiriart, *Nerve growth factor increases sodium channel expression in pancreatic beta cells: implications for insulin secretion*. *Faseb J*, 2002. **16**(8): p. 891-2.
245. Miao, G., et al., *Beneficial effects of nerve growth factor on islet transplantation*. *Transplant Proc*, 2005. **37**(8): p. 3490-2.
246. Miao, G., et al., *In vitro and in vivo improvement of islet survival following treatment with nerve growth factor*. *Transplantation*, 2006. **81**(4): p. 519-24.
247. Bonner-Weir, S., et al., *In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*, 2000. **97**: p. 7999-8004.
248. Yatoh, S., et al., *Differentiation of affinity-purified human pancreatic duct cells to beta-cells*. *Diabetes*, 2007. **56**(7): p. 1802-9.
249. Ramiya, V.K., et al., *Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells*. *Nat Med*, 2000. **6**(3): p. 278-82.
250. Laidlaw, C.F., *Nesidioblastoma: the islet tumor of the pancreas*. *Am J Pathol*, 1938. **14**: p. 125-134.
251. Rosenberg, L., R.A. Brown, and W.P. Duguid, *A new model for the development of duct epithelial hyperplasia and the initiation of nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas*. *J. Surg. Res.*, 1983. **35**(1): p. 371-383.
252. Gao, R., et al., *Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture*. *Diabetes*, 2003. **52**(8): p. 2007-15.
253. Basta, G., et al., *Transdifferentiation molecular pathways of neonatal pig pancreatic duct cells into endocrine cell phenotypes*. *Transplant Proc*, 2004. **36**(9): p. 2857-63.
254. Gatto, C., et al., *Effects of cryopreservation and coculture with pancreatic ductal epithelial cells on insulin secretion from human pancreatic islets*. *Int J Mol Med*, 2003. **12**(6): p. 851-4.

- 255. Yuan, S., et al., *Transdifferentiation of human islets to pancreatic ductal cells in collagen matrix culture*. Differentiation, 1996. **61**(1): p. 67-75.
- 256. Wang, R., J. Li, and L. Rosenberg, *Factors mediating the transdifferentiation of islets of Langerhans to duct epithelial-like structures*. J Endocrinol, 2001. **171**(2): p. 309-18.
- 257. Lu, J., et al., *Adult islets cultured in collagen gel transdifferentiate into duct-like cells*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(22): p. 3426-30.
- 258. Pavlovic, D., et al., *Contribution of ductal cells to cytokine responses by human pancreatic islets*. Diabetes, 1999. **48**(1): p. 29-33.
- 259. Beuneu, C., et al., *Human pancreatic duct cells exert tissue factor-dependent procoagulant activity: relevance to islet transplantation*. Diabetes, 2004. **53**(6): p. 1407-11.
- 260. Keymeulen, B., et al., *Long-term metabolic control by rat islet grafts depends on the composition of the implant*. Diabetes, 1996. **45**(12): p. 1814-21.
- 261. Keymeulen, B., J. Anselmo, and D. Pipeleers, *Length of metabolic normalization after rat islet cell transplantation depends on endocrine cell composition of graft and on donor age*. Diabetologia, 1997. **40**: p. 1152-1158.
- 262. Orive, G., et al., *Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates*. Biomaterials, 2002. **23**(18): p. 3825-31.
- 263. Tam, S.K., et al., *Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation*. Biomaterials, 2005.
- 264. Langlois, G., et al., *Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilized in alginate-based microcapsules*. Acta Biomater, 2009.
- 265. Zhang, W.J., et al., *Purity of alginate affects the viability and fibrotic overgrowth of encapsulated porcine islet xenografts*. Transplant Proc, 2001. **33**(7-8): p. 3517-9.

266. Mallett, A.G. and G. Korbitt, *Alginate modification improves long-term survival and function of transplanted encapsulated islets*. Tissue engineering: Part A, 2009. **15**(6): p. 1301-1309.
267. Martinsen, A., G. Skjak-Braek, and O. Smidsrod, *Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads*. Biotechnology and Bioengineering, 1989. **33**: p. 79-89.
268. Soon-Shiong, P., et al., *An immunologic basis for the fibrotic reaction to implanted microcapsules*. Transplant Proc, 1991. **23**(1 Pt 1): p. 758-9.
269. Corbett, J.A. and M.L. McDaniel, *Intraislet release of interleukin-1 inhibits α cell function by inducing α cell expression of inducible nitric oxide synthase*. Journal of Experimental Medicine, 1995. **181**: p. 559-569.
270. Arnush, M., et al., *IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function*. J Clin Invest, 1998. **102**(3): p. 516-26.
271. Andriambeloson, E., et al., *Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(6): p. 1053-8.
272. Andriambeloson, E., et al., *Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta*. J Nutr, 1998. **128**(12): p. 2324-33.
273. Stoclet, J.C., et al., *Vascular protection by dietary polyphenols*. Eur J Pharmacol, 2004. **500**(1-3): p. 299-313.
274. Tuch, B.E., et al., *Safety and Viability of Microencapsulated Human Islets Transplanted into Diabetic Humans*. Diabetes Care, 2009.
275. Ichii, H., et al., *Characterization of pancreatic ductal cells in human islet preparations*. Lab Invest, 2008. **88**(11): p. 1167-77.
276. de Vos, P. and P. Marchetti, *Encapsulation of pancreatic islets for transplantation in diabetes: the untouchable islets*. Trends Mol Med, 2002. **8**(8): p. 363-6.

277. Sara, V.R. and K. Hall, *Insulin-like growth factors and their binding proteins*. The American Physiological Society, 1990. **70**(8): p. 591-614.
278. Le Roith, D., *Insulin-like growth factor II: gene structure and expression into messenger RNA and protein*, in *Insulin-like growth factors: molecular and cellular aspects*, C. Press, Editor. 1991. p. 87-100.
279. Stempien, M.M., et al., *Sequence of a placental cDNA encoding the mouse insulin-like growth factor II precursor*. DNA, 1986. **5**(5): p. 357-61.
280. Metrakos, P., et al., *Collagen gel matrix promotes islet cell proliferation*. Transplantation Proceedings, 1994. **26**: p. 3349-3350.
281. Street, C.N., et al., *Islet graft assessment in the edmonton protocol: implications for predicting long-term clinical outcome*. Diabetes, 2004. **53**(12): p. 3107-14.
282. Vosters, O., et al., *CD40 expression on human pancreatic duct cells: role in nuclear factor-kappa B activation and production of pro-inflammatory cytokines*. Diabetologia, 2004. **47**(4): p. 660-8.
283. Moberg, L., et al., *Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation*. Lancet, 2002. **360**(9350): p. 2039-45.
284. Johansson, H., et al., *Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1755-62.
285. Sandler, S., et al., *Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets in vitro*. Endocrinology, 1990. **126**(2): p. 1288-94.
286. Cunningham, J.M. and I.C. Green, *Cytokines, nitric oxide and insulin secreting cells*. Growth Regul, 1994. **4**(4): p. 173-80.
287. Dunger, A., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inhibit insulin secretion and cause DNA damage in unweaned-rat islets*. Diabetes, 1996. **45**: p. 183-189.

288. Cetkovic-Cvrlje, M. and D.L. Eizirik, *TNF-alpha and IFN-gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide*. Cytokine, 1994. **6**(4): p. 399-406.
289. Eizirik, D.L., et al., *Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation*. J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 1968-74.
290. Bennett, I.L., Jr. and P.B. Beeson, *Studies on the pathogenesis of fever. I. The effect of injection of extracts and suspensions of uninfected rabbit tissues upon the body temperature of normal rabbits*. J Exp Med, 1953. **98**(5): p. 477-92.

